

2011년 2월  
석사학위 논문

The Role of the Inorganic  
Phosphate in *Salmonella*  
Resistance to Nitric Oxide

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 나 라

The Role of the Inorganic  
Phosphate in *Salmonella*  
Resistance to Nitric Oxide

- 살모넬라의 산화질소 저항성에서 무기인의 역할 -

2011년 2월 25일

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 나 라

# The Role of the Inorganic Phosphate in *Salmonella* Resistance to Nitric Oxide

- 살모넬라의 산화질소 저항성에서 무기인의 역할 -

지도교수 방 일 수

이 논문을 이학 석사학위 신청 논문으로 제출함

2010년 10월

조선대학교 대학원

치의생명공학과

임 나 라

## 임나라의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 홍 중 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 상 응 (인)

위 원 조선대학교 교수 방 일 수 (인)

2010년 11월

조선대학교 대학원

## 목 차

목 차	i
표목차	iv
도목차	v
ABSTRACT	viii
 I. 서론	 1
 II. 실험 재료 및 방법	 4
1. 사용 균주 및 균주 배양조건	4
2. 돌연변이체 제조	4
3. 클론(Clone) 제작	6
4. RNS 처리	6
5. 세균 성장 곡선 측정	
7	
6. RNA 추출	7
7. cDNA 합성 및 정량 PCR	7

8. 무기인 측정 .....	8
9. NO <sub>x</sub> 측정 .....	8
10. 인산염 수송 분석 .....	9
11. 광학 현미경을 이용한 세균 형태 관찰 .....	9
12. 형광 현미경을 이용한 세균 내 산화질소 관찰 .....	10

### III. 표 .....

11

### IV. 결과 .....

13

1. 무기인은 활성질소중에 노출 된 <i>Salmonella</i> 의 복제를 증진시킨다. ....	13
2. 활성질소중은 <i>pst</i> 오페론의 전사를 증가시킨다. ....	15
3. <i>pst</i> 오페론은 낮은 무기인 농도에서 전사가 증가된다. ....	16
4. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 <i>Salmonella</i> 는 활성질소중에 감수성을 가진다. ....	18
5. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 <i>Salmonella</i> 는 무기인의 수송이 감소된다. ....	24
6. 산화질소에 의해 <i>Salmonella</i> 의 내부 무기인 양이 감소된다.	

.....	26
7. 산화질소에 의해 무기인 수송인자가 돌연변이 된 <i>Salmonella</i> 의 형태가 변한다. ....	31
8. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 <i>Salmonella</i> 내에 산화질소가 축적된다. ....	34
9. 무기인 수송인자 돌연변이는 <i>hmp</i> 의 전사과정과 <i>phoB</i> 의 발현에 영향을 미치지 않는다. ....	38
 V. 고찰 .....	 41
 VI. 참고문헌 .....	 44
 VII. 국문초록 .....	 47

## 표 목 차

Table 1. Bacteria strains used in this study.....	23
---	----

Table 2. Primer used for the construction of mutations and qRT-PCR analysis. ....	24
--	----



## 도 목 차

Figure 1. Construction of <i>pst operon::Cm</i> and <i>pitA::Cm</i> mutation in <i>S. Typhimurium</i> 14028S genome. . . .	5
Figure 2. Phosphate promotes <i>Salmonella</i> replication under nitrosative stress conditions. . . . .	14
Figure 3. Transcription of <i>pstS</i> . . . . .	15
Figure 4. Transcription of <i>pst operon</i> genes and <i>pitA</i> . . . . .	17
Figure 5. Growth of WT and phosphate transporter mutants under nitrosative conditions. . . . .	20
Figure 6. Effect of inorganic phosphate to the growth of WT and phosphate transporter mutants under nitrosative stress conditions. . . . .	22

Figure 7. Growth of WT, <i>rpoS</i> and phosphate transporter mutants under oxidative stress conditions. ....	23
Figure 8. The inorganic phosphate transport rate of <i>S. Typhimurium</i> . ....	25
Figure 9. Measurement of the inorganic phosphate by Malachite Green Phosphate Assay. ....	27
Figure 10. Measurement of the nitrite by Griess Reagent. ....	29
Figure 11. The effect of RNS on the inorganic phosphate of <i>S. Typhimurium</i> . ....	30
Figure 12. Morphology of WT and phosphate transporter mutants. ....	33
Figure 13. Detection of Nitric oxide in wild-type and phosphate transporter mutants. ....	34

Figure 14. Growth of WT, *phoB* and phosphate transporter mutants under nitrosative conditions. ····· 35

Figure 15. *hmp* transcription.····· 39

Figure 16. Reduction scheme for the detection of nitric oxide by DAF-FM and DAF-FM diacetate. ····· 40

# ABSTRACT

## The Role of the Inorganic Phosphate in *Salmonella* Resistance to Nitric Oxide

Lim, Na Ra

Advisor : Prof. Bang, Iel-Soo, PhD

Department of Biodental engineering,  
Graduate School of Chosun University

Bacterial pathogens such as *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can replicate against attack of nitric oxide(NO) and NO-mediated reactive nitrogen species produced by host animals. This study have identified that inorganic phosphate transporters of *Salmonella* are essential for their replication against nitrosative stress. The phosphate homeostasis of *S. typhimurium* is mainly regulated by two inorganic phosphate uptake transporter systems, the high-affinity transporter, Pst and the low-affinity transporter, Pit. The growth of *Salmonella* mutant lacking both transporters is severely impaired in the culture media containing NO congeners such as spermineNONOate. Moreover, supplementation of inorganic phosphate into the culture media restores the growth rate of wild-type *Salmonella* under nitrosative stress conditions. NO induces transcription of *pst operon* but not *pit operon*, which resembles transcription of two operons in response to phosphate limitation, suggesting possible interactions between inorganic

phosphate and NO. Levels of inorganic phosphate and NO remains unchanged when combined together *in vitro*, but levels of inorganic phosphate inside *Salmonella* decreases in the presence of NO. The microscopic analysis of *pst pitA* mutants shows the lengthened cell morphology and increase of NO-mediated fluorescence of DAF-FM(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate accumulated inside cell by NO exposure, implicating that defective transport of inorganic phosphate damages bacterial division and NO metabolism. These results suggest that maintenance of phosphate homeostasis is crucial for *Salmonella* replication against nitrosative stress.

## I. 서론

*Salmonella*는 그람-음성의 혐기성 세균이다. *Salmonella*의 감염은 오염된 음식이나 물 또는 덜 익힌 육류를 통해 이루어지며,  $10^3$ 이하의 적은 균의 양으로도 감염을 일으킬 수 있다. 숙주에 침투한 *Salmonella*는 다양한 질병을 야기 한다. 최근 들어 내성 균주가 증가하고 있어 치료 약제의 선택에 어려움이 있는데, *Salmonella*는 전신감염을 할 수 있고, 유전자 재조합 기법이 *Escherichia coli*만큼 잘 알려져 있어 미생물의 병원성 연구에 많이 쓰이는 모델이다. 그 중 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium은 쥐에서 전신감염을 일으키는 세균으로 쥐 외에도 소, 돼지, 말, 양이나, 닭, 칠면조, 오리와 같은 가금류도 감염시킨다[1]. *Salmonella*에 감염된 숙주는 여러 가지 항세균 메커니즘이 발현되는데 그 중 하나가 식세포작용으로 전염성이 강한 *Salmonella*를 더 이상 증식하지 못하도록 숙주 내에서 제거 시킨다[2-3]. 대식세포에서는 활성질소종(reactive nitrogen species: RNS)이나 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)이 생성되는데 이것들은 *S. Typhimurium*에 감염된 쥐의 대식세포에 작용해 *S. Typhimurium*의 생존을 억제한다[2, 4].

초과산화물(superoxide;  $O_2^{\cdot -}$ )나 과산화수소(hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ )와 같은 활성산소종은 세균을 치사 시킬 수 있다. 활성산소종은 산소가 있는 조건에서 생성되는데, 산소에서 초과산화물, 과산화수소, 히드록실라디칼(hydroxyl radical;  $OH^{\cdot}$ )이 생성된다. 초과산화물이나 과산화수소는 세균을 치사 시킬 수 있는 능력을 가지고 있다. 그러나 *S. Typhimurium*은 다량의 활성산소종을 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD)와 과산화수소를 분해하는 카탈라아제(catalase; Kat)의 해독작용에 의해 물이나 산소로 분해하여 생존할 수 있다[5]. 산화질소(nitric oxide)는 병원성 미생물의 증식을 저해할 수 있는 선천 면역 시스템 중에 필수적인 구성성분 중에 하나다[3]. 산화질소는 유도성 일산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS)에 의해 생성된다[6]. 산화질소는 단백질, thiol, 지질 이중층, DNA를 포함하는 다양한 세포 내 표적을 공격하여 세균의 성장을 억제 한다[7-9]. 그러나 *Salmonella*의 flavohemoglobin Hmp는 숙

주에서 발생하는 산화질소를 해독한다[10]. Hmp는  $O_2^-$  의존성 denitrosylase 대사과정으로 호기성 또는 미세호기성 조건 하에서 생성된 산화질소를 질산염( $NO_3^-$ )으로 해독시키고, 혐기성 조건에서는  $O_2^-$  독립적 deoxygenase 대사과정에 의해 산화질소를 아산화질소( $N_2O$ )로 환원시킨다[10].

본 연구에서는 *S. Typhimurium* Hmp 이외에 산화질소 및 활성질소종 저항 기작이 존재하는지 알아보기 위해 무작위 트랜스포존 돌연변이 스크리닝을 수행하였다. 이 과정에서 활성질소종이 첨가된 배지에서 자라지 못하는 콜로니를 찾았고, 시퀀싱 결과 세균 내에서 무기인(inorganic phosphate;  $P_i$ ) 농도를 조절하는 *pst* 오페론 중에 하나인 *pstB* 유전자 내에 트랜스포존이 삽입된 것을 확인하였다. 이 결과는 *S. Typhimurium*의 산화질소 저항성에 무기인의 수송이 관여한다는 것을 보여준다.

무기인은 세균이 살아가기 위해 필요로 하는 필수 영양분 중에 하나로 세균 내의 막 지질, 리포폴리사카라이드, 핵산의 필수 구성 성분 중에 하나다. 그리고 인산화와 탈 인산화를 통한 세포와 세포 사이의 대사과정 또는 단백질이나 유전자를 조절하는 생화학적 반응에도 이용되고 에너지 대사과정에도 중요한 역할을 한다. 세균은 변화하는 외부 환경에 대응하여 항상성을 유지하는 것이 중요한데, 인의 항상성 또한 세균 대사에 필수적이다. *E. coli*에서 알려진 인산염의 근원에는 무기인, 유기 인산염(organophosphate), 포스포산(phosphonic acid)이 있다. *E. coli*와 *S. Typhimurium*에서 대표적으로 무기인의 항상성을 유지하는 것은 Pho 레귤론(regulon)이다. Pho 레귤론 유전자들은 두 가지 구성인자 조절 시스템에 의해서 조절 되는데, 하나는 반응 조절체 PhoB이고 다른 하나는 PhoB의 파트너인 인산염 감지 인산화효소, PhoR이다. Pho 레귤론은 세포 내에 인산염이 부족한 조건에서 발현되며, 그 중에는 ABC superfamily계의 높은 친화력을 가진 인산염 수송자(phosphate transporter), Pst가 있다. Pst 수송 시스템은 *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*로 구성되어 있는 오페론에 의해 생산된다[11]. 그리고 Pst 오페론과 함께 상호작용하는 PhoR/PhoB 두 가지 구성인자 조절 시스템이 있다. Pst 오페론은 인산염 농도에 따라 발현이 조절되는데[12], *E. coli*를 대상으로 한 연구를 통해 밝혀진 사실과 예상되는 가설은 다음과 같다. 세포 내 인산염의 농도가 낮을 때에는 세포 밖에 있던 무기인이 주변 세포질(periplasm) 내에 존재하

는 단백질, PstS에 결합한다. 그리고 결합한 무기인은 내막 채널 단백질들, PstC와 PstA의 사이를 통과해 세포질로 들어오는데, 이 때 ATP-의존적인 투과효소 구성인자, PstB가 무기인을 주변 세포질에서 세포질로 수송될 수 있는 에너지를 제공한다. 세포질로 들어온 무기인에 의해 PhoR이 활성화된다. PhoR은 다시 PhoB를 활성화 시키고[13], 활성화된 PhoB는 phospho-PhoB 복합체를 형성한다. 형성된 phospho-PhoB 복합체는 PHO boxes라 불리는 프로모터 부위에 결합하고, 그 결과 pst 오페론을 포함하는 Pho 레귤론의 전사가 증가된다[14]. 반대로 세포 내에 인산염의 농도가 높을 경우에는 Pho 레귤론의 억제제로 작용하는, PhoU의 조절을 받을 것으로 예상된다[15]. PhoU는 Pho 레귤론인 PstS, PstC, PstB, PstA의 활성을 억제 시키고, PhoR에 결합해 인산화를 막는 것으로 예상되고 있다. 그 결과 무기인이 세포질 안으로 들어오지 못하게 됨으로써 세포 내의 인산염 농도가 다시 낮아지게 된다. *S. Typhimurium*의 또 다른 인산염 수송자는 Pit family인, 낮은 친화력을 가진 인산염 수송자, PitA다. 인산염 농도에 따라 발현이 조절되는 Pst 수송 시스템과 다르게 Pit 수송 시스템은 인산염 농도에 상관없이 발현하는 수송자로 높은 인산염 농도에서 무기인을 수송하지만[16] Pst 시스템 만큼 큰 역할은 하지 못하는 것으로 알려져 있다[17]. 그리고 아연과 같은 금속성의 이온은 PitA의 발현을 증가시킨다[18].

본 연구에서는 무기인을 수송하는 Pst 수송자와 Pit 수송자가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*을 제조하여 활성질소중 환경에서 무기인의 역할과 조절과정을 연구했다.



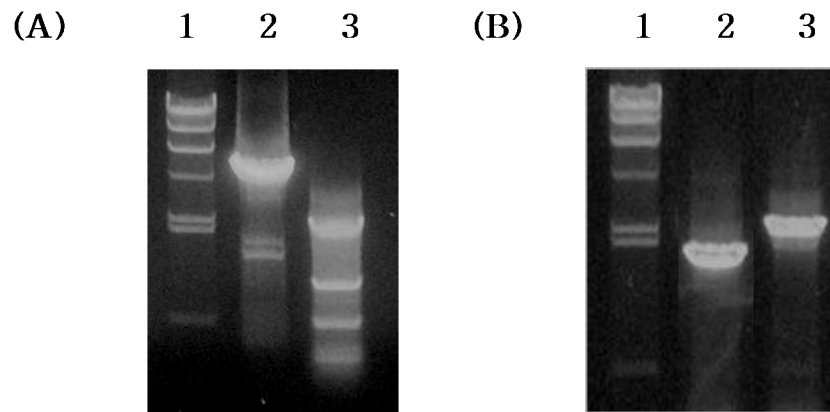
## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 사용 균주 및 균주 배양조건

본 연구에서는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s 야생형 균주 (WT)를 사용했고, *S. Typhimurium*의 돌연변이체는 Table 1.에 나타냈다. 균주의 배양에 쓰인 배지는 Luria-Bertani(LB) 영양배지와 0.2% glucose를 포함한 E 최소배지(2g/L  $\text{H}_3\text{C}_6\text{HPO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1g/L  $\text{MgSO}_4$ , 13g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 3.5g/L  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 그리고 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS) 최소배지를 사용했다. MOPS 배지에는 0.4% glucose, 0.25% casamino acid를 첨가했다. 낮은 무기인 조건에서는 0.1mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 사용했고, 높은 무기인 조건에서는 10mM의  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 사용했다. 균주는 진탕 배양기에서 220rpm, 37°C로 배양했다.

### 2. 돌연변이체 제조

*S. Typhimurium* 14028s의 돌연변이체 제조는 Lamda-Red recombinase를 이용한 재조합기술을 수정하여 사용했다[27]. *pst operon*과 *pitA* 돌연변이체를 만들기 위해 각각의 유전자 일부를 결손 시키고 그 자리에 chloramphenicol cassette를 삽입했다(Table 2). chloramphenicol cassette 삽입은 PCR 증폭기술을 이용하였는데 주형으로는 pKD3 플라스미드를 이용했다. PCR 증폭 후 PCR 산물은 PCR 정제 키트(GeneAll)을 이용해 정제했고, Dpn I 효소(NEB)를 처리했다. 그리고 Lamda-Red recombinase를 발현시키는 균주에 형질전환 했다. Chloramphenicol이 들어있는 배지에서 항생제 저항 부분을 가지고 있는 콜로니를 분리하고, 이렇게 만들어진 *pst operon*과 *pitA* 돌연변이주는 PCR을 통해 유전자 내에 chloramphenicol cassette의 삽입을 확인했다(Figure 1). 그리고 P22를 이용해 14028s에 형질도입 했다[27].



**Figure 1. Construction of *pst operon::Cm* and *pitA::Cm* mutation in *S. Typhimurium* 14028S genome.**

**(A)** PCR products obtained with primers flanking *pst operon* gene from WT (5kb; lane 2) and *pst operon::Cm* mutant (2.3kb; lane 3) *Salmonella* were electrophoresed on a 1% agarose gel. **(B)** PCR products obtained with primers flanking *pitA* gene from WT (1.9kb; lane 2) and *pitA::Cm* mutant (2.4kb; lane 3). Lane 1 shows a DNA/*Hind*III molecular weight marker.

### 3. 클론(Clone) 제작

*pst* 오페론 클론(5031bp)을 만들기 위해 PCR 증폭을 통해 원하는 유전자 산물을 얻었다. PCR 증폭에 사용된 재료는 주형으로는 *S. Typhimurium* 14028s 염색체가 사용됐고, 프라이머에는 *pstS* FWD 프라이머와 *phoU* REV 프라이머가 사용됐다(Table. 2). 그리고 Han-Pfu 중합효소(Genenmed Inc)를 이용해 PCR 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 정제 키트를 이용해 정제했고, 클로닝을 위한 제한효소 처리는 *phoU* REV 프라이머 부분에 있는 제한효소 Sal I (NEB)을 처리했고 이렇게 얻은 산물은 gel 정제 키트(GeneAll)를 이용해 정제한 후 Sal I 과 Sma I (NEB)을 처리한 puc19 벡터에 결찰 시켜 DH5a에 형질전환 시켰다. 콜로니를 분리해 LB 배지에 하루 동안 키운 후 각각의 세균에 페놀 용액을 넣고 섞었다. 그리고 1% agarose gel에 로딩해서 대조 벡터에 비해 크기가 큰 밴드가 나온 산물을 골라 플라스미드를 순수분리 했다. 뽑은 플라스미드에 EcoR I (NEB)과 Sal I 을 처리해 *pst* 오페론 클론(5031bp)을 최종 확인했다. *pitA* 클론(1940bp)을 만들기 위해 프라이머에는 *pitA* FWD 프라이머와 *pitA* REV 프라이머가 사용됐다(Table. 2). 그리고 *i*-pfu DNA 중합효소(iNtRON)를 이용해 PCR 증폭시켰다. PCR 산물은 PCR 정제 키트를 이용해 정제했고, 클로닝을 위한 제한 효소 처리는 제한효소 HindIII(NEB)를 처리했고, HindIII와 Sma I 을 처리한 pBAD18 벡터와 결찰해 DH5a에 형질전환 시켰다. 콜로니를 분리해 LB 배지에 하루 동안 키운 후 플라스미드를 순수분리 했다. 순수분리 한 플라스미드에 EcoR I 과 HindIII을 처리해 *pitA* 클론(1940bp)을 최종 확인했다.

### 4. RNS 처리

산화질소 공여체로써 cayman chemical로부터 구입한 spermine NONOate (sperNO)와 S-Nitrosoglutathione(GSNO)가 사용됐다. GSNO는 sodium nitrite와 glutathione을 이용하여 제조했다. sperNO와 GSNO는 -80℃에서 보관 되었고, 농도는 500mM stock solution을 사용할 때 마다 희석하여 사용했다.

## 5. 세균 성장 곡선 측정

0.2% glucose가 함유된 E 최소배지와 0.4% glucose, 0.25% casamino acid, 0.1mM  $K_2HPO_4$  또는 10mM  $K_2HPO_4$ 가 함유된 MOPS 배지에서 농도별로 sperNO를 처리했다.  $H_2O_2$ 는 LB배지에 처리 했으며, GSNO는 0.2% glucose가 함유된 E 최소배지에 처리했다. 세균의 성장곡선을 측정하기 위해 먼저 LB배지에 20시간 정도 세균을 배양한 후 phosphate buffered saline(PBS)에  $OD_{600}$  값이 1이 되게 희석한 후 배지가 든( $200\mu l$ ) microplate에 다시  $OD_{600}$  값이 0.02가 되게 세균을 접종했다. microplate는 Transgalactic Ltd사의 Bioscreen C Microbiology Microplate Reader에서 37°C온도에서 교반되면서 24시간동안 배양됐고, 30분마다 흡광도( $O.D=600nm$ )를 측정했다.

## 6. RNA 추출

세균의 전체 RNA는 TAKARA사의 RNAiso Plus를 이용해 추출했다. 배양한 세균 1ml을 침전 시킨 후 RNAiso Plus를 1mL 넣어 주고 혼합한 후 상온에서 5분 정치했다. 다음 0.2배의 클로로포름을 넣고 섞어 주고 상온에서 5분 정치시킨 후, 12,000g, 4°C, 15분 조건으로 원심분리기를 이용해 침전 시킨 후 상층액만 조심스럽게 새 튜브에 옮겼다. 그리고 0.5배의 이소프로판올을 넣고 상온에서 10분 정치시키고 12,000g, 4°C, 10분 조건으로 원심분리기를 이용해 침전 시켜 RNA를 분리했다. 75% 에탄올(-20°C)을 이용하여 세척 후 건조시켜 물에 용해했다. 남아 있는 DNA는 SIGMA사의 Deoxyribonuclease I (DNase I)을 이용해 제거했다.

## 7. cDNA 합성 및 정량 PCR

RNA는 Promega사의 RNasin, Random primer, M-MLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성했다. cDNA 합성 조건은 25°C;10분, 37°C;60분, 90°C;5분로 했다. 정량 PCR은 SolGent사 e-Taq DNA 중합효소를 사용하여 진행됐다.

정량 PCR 조건은 95℃;5분, 95℃;40초, 50℃~58℃;30초, 72℃;30초, 72℃;7분이다.

## 8. 무기인 측정

무기인 측정은 *in vitro*(세균 밖)와 *in vivo*(세균 안)상에서 진행됐다. 먼저 *in vitro*상에서의 무기인의 측정은 MOPS 배지에 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 spermine NONOate를 처리 한 후 진탕 배양기에서 1시간동안 배양한 후 측정 됐다. 측정은 BioAssay System사의 Malachite Green 단백질 분석 키트로 진행됐다. 먼저 Regent A 100 배 당 Regent B 1배를 섞어 Working Reagent를 만들어 놓았다. 96-well plate 에 샘플 80μl과 Working Reagent를 20μl분주한 후 섞이도록 플레이트를 가볍게 쳐준다. 상온에서 30분 기다린 후 ri-fluorescence spectro- photometer로 595nm 파장에서 값을 읽었다. *in vivo* 실험은 *S. Typhimurium* 세균을 로그기 (OD<sub>600</sub>=0.5)까지 키운 후 spermine NONOate를 1mM를 처리하고 진탕 배양기에서 1시간동안 배양한 후 멸균된 3차 증류수로 세균을 3번 세척했다. 초음파발생 장치로 세균을 파쇄하고 단백질 정량을 했다. 정량은 Bio Rad사의 DC 단백질 분석을 통해 진행됐다. 동량의 단백질이 들어있는 샘플 용액을 Malachite Green 단백질 분석 키트를 이용하여 무기인의 농도를 측정했다.

인산염 기준 곡선은 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40μM 인산염 80μl를 96-well 플레이트에 분주 후 Working Reagent를 20μl을 섞어주고 30분 상온에서 반응시킨 후 595nm파장에서 측정했다.

## 9. NO<sub>x</sub> 측정

NO<sub>x</sub> 측정은 Griess 분석을 통해 실험되었다. Griess 분석은 배지 내에서 산화 질소와 무기인이 화학적으로 반응하는지 알아보기 위해 *in vitro*상에서 수행됐다. MOPS 배지에 spermine NONOate 1mM을 처리한 후 진탕 배양기에서 1시간동안 반응시켰다. 반응액 50μl를 96-well 플레이트에 분주한 후 NADPH 10μl, master mix(14mM sodium phosphate buffer 10μl, glucose-6-phosphate

dehydrogenase 10 $\mu$ l, glucose-6-phosphate 10 $\mu$ l, nitrate reductase 10 $\mu$ l ) 40 $\mu$ l  
를 넣고 빛이 들어오지 않는 25°C에서 20분간 반응시켰다. 그 후 Griess reagent  
100 $\mu$ l 섞어 주고 다시 빛이 들어오지 않는 25°C에서 15분간 반응시켰고  
ri-fluorescence spectrophotometer로 565nm 파장에서 측정했다.

기준 곡선은 아질산염 기준 곡선으로 PBS로 녹인 1M 아질산나트륨을 만든 후  
96-well 플레이트에 0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu$ M로 희석하여 Griess  
분석을 수행했다.

## 10. 인산염 수송 분석

0.2% glucose가 포함된 E 최소배지에 *S. Typhimurium* 야생형 균주와 돌연변이  
균주를 OD<sub>600</sub> 값이 0.5가 될 때까지 키운 후 0.2% glucose가 포함된 MOPS 배지  
에서 2번 세척 후 상층 액은 버리고 펠렛을 2ml의 0.2% glucose가 포함된  
MOPS 배지에 섞었다. 그리고 spermineNONOate 1mM을 처리 했다. <sup>32</sup>P는  
IZOTOP사의 Orthophosphate-[ <sup>32</sup>P] (HCl and Carrier-free)를 10 $\mu$ M를 처리하고  
시간대 별로 관찰했다. <sup>32</sup>P 측정을 위해 진공기에 설치된 니트로셀룰로오스 막  
여과 종이(0.45 $\mu$ m pore size)에 샘플 500 $\mu$ l를 떨어트린 후 0.85% 식염수로 니트  
로셀룰로오스 막 여과 종이를 3회 세척했다. 니트로셀룰로오스 막 여과 종이에  
남아있는 세균의 <sup>32</sup>P 측정은  $\beta$ -counter (Tri-Carb 2100TR liquid scintillation  
analyzer)를 사용했다.

## 11. 광학 현미경을 이용한 세균 형태 관찰

*S. Typhimurium* 야생형 균주와 돌연변이체들을 LB 배지에 접종 후 37°C 진탕  
배양기에서 16시간 동안 배양 후 0.2% glucose가 함유된 E 최소배지에 배양된  
균주를 1:200으로 희석하여 접종하고 GSNO 1mM을 처리했다. 그리고 37°C 진탕  
배양기에서 14시간 배양했다. 균주는 Icc1(Carl Zeiss, Germany) 카메라와 Primo  
star(Carl zess, Germany) 현미경으로 관찰 했다.

## 12. 형광 현미경을 이용한 세균 내 산화질소 관찰

*S. Typhimurium* 야생형 균주와 돌연변이 균주를 LB 배지에 접종 후 37°C 진탕 배양기에서 키운 후 0.2% glucose가 함유된 최소배지에서 16시간 37°C 진탕 배양기에서 키웠다. 그리고 spermineNONOate 3mM을 6시간 30분 처리한 후 Molecular Probes사의 DAF-FM(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate를 2시간 처리했다. DAF-FM diacetate의 excitation maxima는 495nm이고 emission maxima는 515nm이다. 세균 내 산화질소와 반응하는 DAF-FM의 존재는 iCHM1.4(IMT, Canada) 카메라와 Axioscope A1(Carl zeiss, Germany) 형광 현미경으로 관찰 했다.

### III. ㅂ

**Table 1. Bacteria strains used in this study.**

straiNO	genotype	Source
IB1	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium 14028s	ATCC
IB1006	<i>rpoS::Tn10dcm</i>	J.W.Foster
IB1134	$\Delta pstS::CM$	This study
IB1123	$\Delta pstC::CM$	This study
IB1122	$\Delta pstA::CM$	This study
IB1176	$\Delta pstB::CM$	This study
IB1124	$\Delta phoU::CM$	This study
IB1098	$\Delta phoB::CM$	This study
IB1148	$\Delta phoR::CM$	This study
IB1174	$\Delta pst\ operon::CM$	This study
IB1187	$\Delta pitA::CM$	This study
IB1195	$\Delta pst\ operon\ pitA::CM$	This study
IB1319	$\Delta pst\ operon::CM/pst\ operon\ clone::AP$	This study
IB1320	$\Delta pst\ operon\ pitA::CM/pst\ operon\ pitA\ clone::AP$	This study



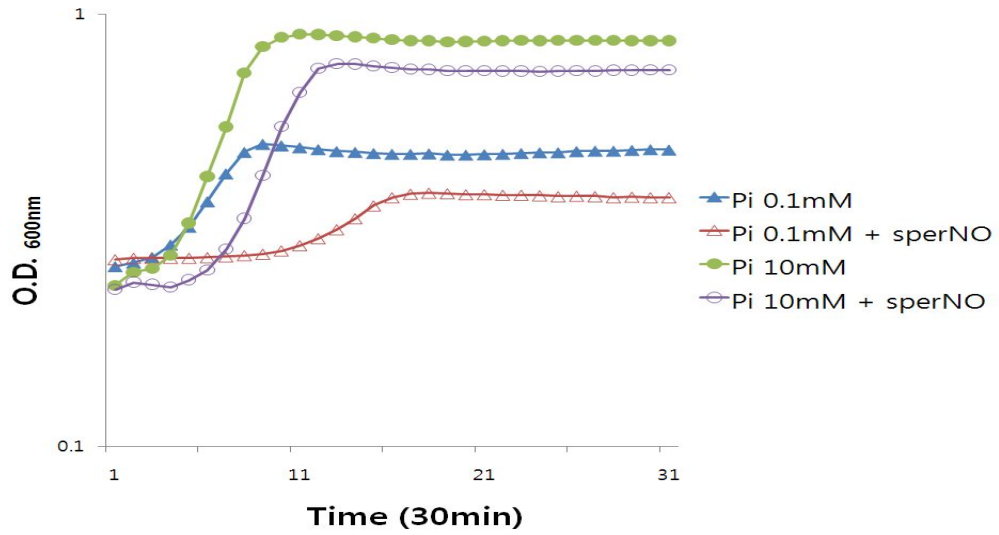
**Table 2. Primer used for the construction of mutations and quantitative real-time PCR analysis.**

Primer name	Primer DNA sequence
pst operon P1 FWD	5'-gggtgtggcgg cccagtgact ccagactcac cagcagc ggc gtgtaggctg gagctgcttc-3'
pst operon P2 REV	3'-atcgaaagtg ggcgcgggtt ctaccgtgaa ctggccaa cc catatgaata tctctcttag-5'
pitA P1 FWD	5'-ggacgcgtat cgcgctgac ctctccgcta tcggcgtggc gtgtaggctg gagctgcttc-3'
pitA P2 REV	3'-cgccagccga tcacgtacc aatacccagc gccaacg cca catatgaata tctctcttag-5'
pstS FWD	tgcggtaga acatgtgatg
phoU REV	cgatcac cctaacgtg
pitA FWD	ccagcgccta taataacggc
pitA REV	gtggtggtaa gcttgattgc
<b>&lt;qRT-PCR&gt;</b>	
rpoD FWD	gtgaaatgggcactgttgaactg
rpoD REV	ttccagcagataggtaatggcttc
pstS FWD	caggtttcttctgcgcttg
pstS REV	ggctctgggcggtaaaggtaa
pstC FWD	tcgagctggttaagtgttgcc
pstC REV	gcctttggtatcggcattct
pstA FWD	gagagcgcggtaaacaacaa
pstA REV	tcaattgttggtgggctgtt
pstB FWD	tccagagctgaacatggctc
pstB REV	cgcaaaagtggggatggtat
phoU FWD	tgatgctgctgggagaattt
phoU REV	gcatccgcactcaggtaatg
pitA FWD	tggcaaacgtggaaagctac
pitA REV	tcaattgttggtgggctgtt

## IV. 결 과

### 1. 무기인은 활성질소종에 노출 된 *Salmonella*의 복제를 증진시킨다.

활성질소종 스트레스에 노출된 *S. Typhimurium*의 복제에 무기인의 역할을 알아보기 위해 sperNO가 첨가되거나 첨가되지 않은 0.1mM 무기인 또는 10mM 무기인이 첨가된 MOPS 배지에서 *S. Typhimurium* 야생형 균주(WT)를 24시간 동안 배양시켜 성장 패턴을 알아보았다(Fig. 2). 먼저 야생형 균주는 0.1mM 무기인이 첨가된 배지에서는 5시간이 지나면서 정지기에 들어갔다. 그러나 0.1mM 무기인이 첨가된 배지에 sperNO 500 $\mu$ M을 처리한 균주에서는 9시간이 지나서야 정지기에 들어갔다. 반면에 10mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 균주는 5시간 30분이 지나서 정지기에 들어가고, sperNO를 처리한 균주에서는 6시간 30분이 지나서 정지기에 들어갔다. 0.1mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 균주는 OD<sub>600</sub>에서 0.501까지 최종 성장했고, sperNO를 처리한 균주에서는 OD<sub>600</sub>에서 0.384까지 최종 성장했다. 10mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 균주는 OD<sub>600</sub>에서 0.888까지 최종 성장했으며 sperNO를 처리한 균주에서는 OD<sub>600</sub>에서 0.75까지 최종 성장했다. 낮은 무기인 조건에서 sperNO까지 처리하면 성장이 많이 지연되는 걸 확인 했다. 반면 높은 무기인 조건에서 자란 *Salmonella*는 낮은 무기인 조건에서 보다 1.8배 정도 성장이 잘 되고 sperNO를 처리한 조건에서도 조금 감수성을 보이긴 하나 복제에 지장이 없는 것을 확인 했다. 따라서 무기인이 *Salmonella*의 복제를 증진시키고 활성질소종 스트레스에 대해 저항성을 증가시키는 사실을 확인했다.

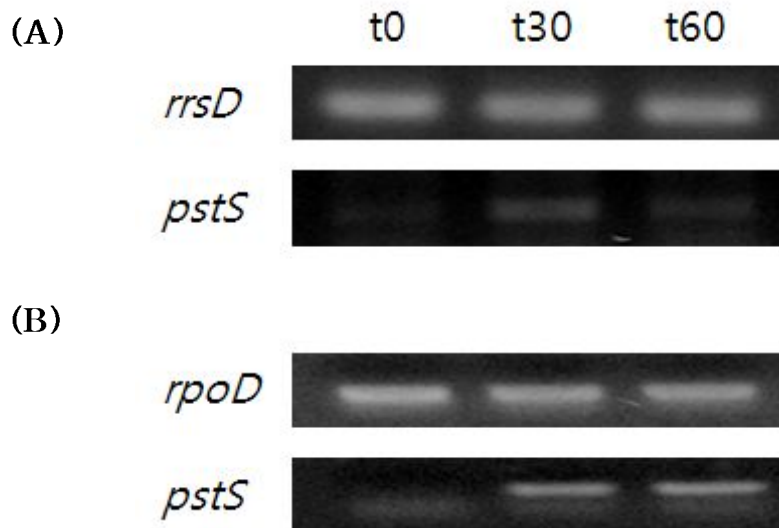


**Figure 2. Phosphate promotes *Salmonella* replication under nitrosative stress conditions.**

*S. Typhimurium* WT cells were cultured in the MOPS media containing 0.1mM Pi (triangles), 10mM Pi (circles) with (opened symbols) or without (closed symbols) spermineNONOate(500 $\mu$ m).

## 2. 활성질소종은 *pst* 오페론의 전사를 증가시킨다.

활성질소종을 처리한 *S. Typhimurium* 야생형 균주에서 *pst* 오페론의 전사 정도를 알아보았다. *S. Typhimurium* WT에 GSNO 1mM를 처리 하고 30분 후에 *pstS*의 전사가 증가했다(Fig. 3A). 그리고 sperNO 1mM 처리한 30분과 60분에서 *pstS*의 전사가 증가했다(Fig. 3B). *rpoD*는 housekeeping 유전자로써 대조 유전자로 사용되었다. 따라서 *Salmonella*의 *pst* 오페론 전사가 활성질소종 스트레스에 의해 증가된다.

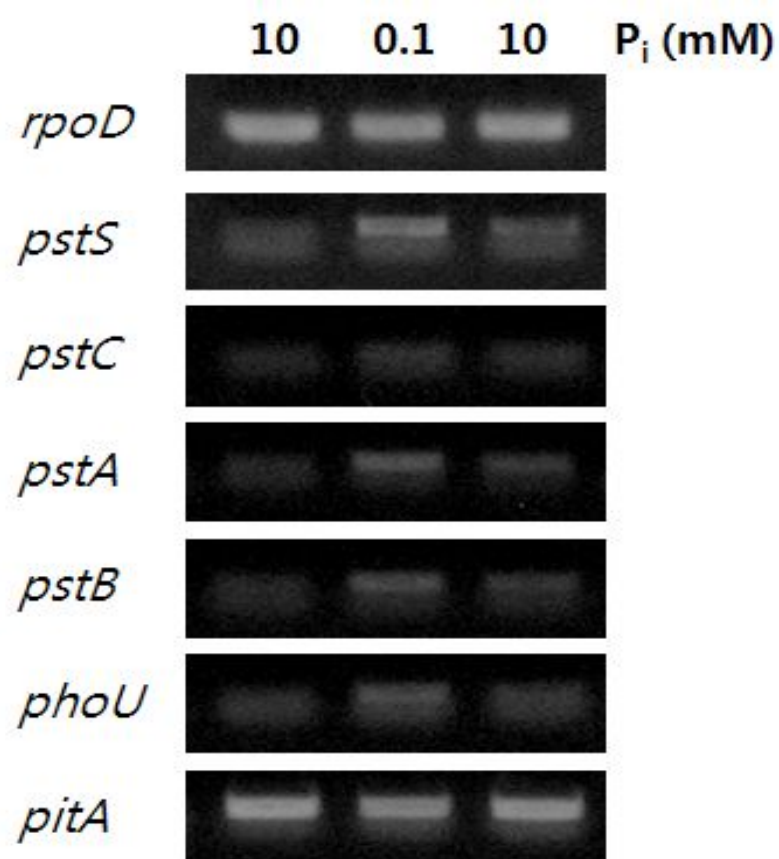


**Figure 3. Transcription of *pstS*.**

*S. Typhimurium* WT cells were cultured in the minimal E media and treated with S-Nitrosoglutathione (1mM; **A**) and spermineNONOate (1mM; **B**). mRNA levels were measured by quantitative reverse-transcriptase PCR assay of total RNA purified from cultures. Housekeeping genes *rrsD* and *rpoD* was used as normalization controls.

### 3. *Pst* 오페론은 낮은 무기인 농도에서 전사가 증가된다.

일반적으로 *E. coli*에서 *pst* 오페론은 낮은 무기인 조건 하에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. *S. Typhimurium*의 *pst* 오페론도 무기인 농도에 따라서 발현이 조절 되는지 알아보기 위해서 전사량을 측정하였다(Fig. 4). *S. Typhimurium* 야생형 균주를 10mM  $K_2HPO_4$ , 0.4% glucose, 0.25% casaminiacide가 함유된 MOPS 배지에서 OD<sub>600</sub>에서 0.5가 될 때까지 키운 후 0.1mM과 10mM 무기인이 함유된 MOPS 배지에 옮겨 다시 OD<sub>600</sub>에서 0.5가 될 때까지 키웠다. qRT-PCR 결과를 보면, 처음 10mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 것보다 이후의 10mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 것에서 *pstS*의 전사가 거의 되지 않았다. 그러나 0.1mM 무기인이 첨가된 배지에서 키운 균주의 *pstS* 전사량이 크게 증가했다. *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU* 역시 10mM 무기인이 첨가된 배지에서보다 0.1mM 무기인이 첨가된 배지에서 전사량이 증가했다. *pitA*는 *E. coli*에서 무기인 농도와 상관없이 발현되는 것으로 알려져 있는데 *S. Typhimurium*에서도 마찬가지로 무기인 농도와 상관없이 발현됐다.



**Figure 4. Transcription of *pst operon* genes and *pitA*.**

*S. Typhimurium* WT cells were cultured in the MOPS media containing 10mM Pi until OD<sub>600nm</sub>=0.5 and collected, then transferred into MOPS media containing 0.1mM or 10mM Pi. mRNA levels were measured by quantitative reverse-transcriptase PCR assay of total RNA purified from cultures. A housekeeping gene *rpoD* was used as a normalization control.

#### 4. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 *Salmonella*는 활성질소종에 감수성을 가진다.

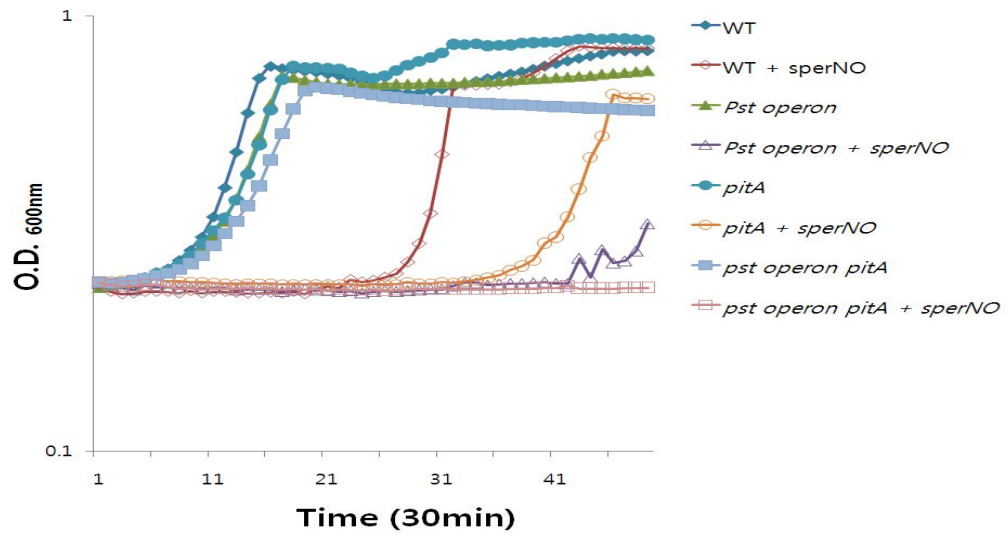
세균의 활성질소종 저항성에서 Pst 와 Pit 무기인 수송 시스템의 역할을 알아보기 위해 *S. Typhimurium* WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $pitA$  균주를 0.2% glucose가 함유된 최소배지에 sperNO 1mM을 처리한 후 24시간 동안의 성장 패턴을 알아보았다(Fig. 5A). 먼저 sperNO를 처리하지 않는 균주들은 거의 비슷하게 OD<sub>600</sub>에서 0.68~0.8까지 자랐으며 8시간이 지난 후에 정지기로 들어갔다. 그러나 sperNO를 처리한 균주들에서는 차이점을 보이는데 먼저, sperNO를 처리 한 WT은 18시간 후에 정지기에 들어갔고,  $\Delta pst$  operon은 22시간 후에 증식기에 들어갔고,  $\Delta pitA$ 는 23시간 후에 정지기에 들어갔으며,  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 는 24시간 배양 동안 전혀 성장하지 못했다. 반면  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 에 *pst* 오페론 클론 플라스미드를 형질전환 시킨 균주는 성장이 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 5C). GSNO를 처리한 배지에서 키운 균주 역시 GSNO에 감수성을 가졌다(Fig. 5B). 그리고 0.1mM 무기인을 함유한 MOPS 배지에서의 성장 패턴을 보면 WT보다  $\Delta pitA$ 가 조금 감수성을 보이며,  $\Delta pst$  operon에서는 WT과  $\Delta pitA$ 에 비교해서 정지기가 빨리 오고 OD<sub>600</sub>에서 0.4까지 밖에 성장하지 않았다. 그리고  $\Delta Pst$  operon  $pitA$ 는 전혀 성장하지 않았다. sperNO 500 $\mu$ M을 처리 한 배지에서는 WT,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta Pst$  operon,  $\Delta Pst$  operon  $pitA$  순으로 감수성이 증가했다(Fig. 6A). 그리고 10mM 무기인을 함유한 MOPS 배지에서의 성장 패턴을 보면 0.1mM 무기인이 함유된 배지에서 자란 것 보다 균주들이 OD<sub>600</sub>에서 0.9까지 잘 자랐고,  $\Delta pst$  operon  $pitA$  역시 잘 자랐다. sperNO 처리 시에도 WT,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pst$  operon  $pitA$  순으로 약간씩 감수성이 증가했다(Fig. 6B). 따라서 sperNO 처리 시 WT,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pst$  operon  $pitA$  순으로 감수성이 증가한 것으로 보아 *pst* 오페론이 *pitA*보다 활성질소종 스트레스에 더 저항성을 가질 수 있게 해주며, *pst* 오페론과 *pitA*가 둘 다 돌연변이 되면 *S. Typhimurium*은 활성질소종 스트레스에 더욱더 감수성을 가진다. 그리고 낮은 무기인 조건 하에서는  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 이 전혀 자라지 않는 것으로 보아 *S.*

Typhimurium이 활성질소종 스트레스 환경에서 자라기 위해서는 무기인이 필요하다는 것을 확인하였다.

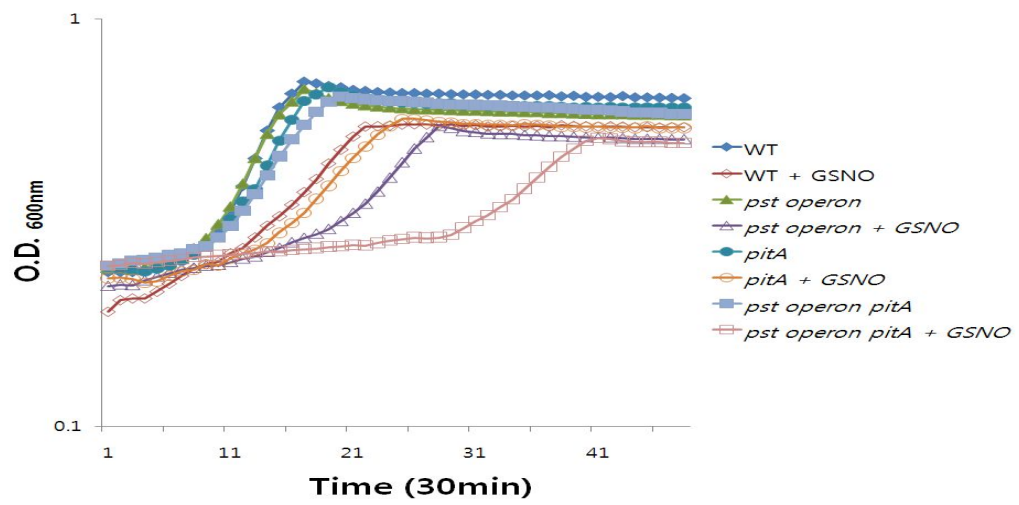
무기인 수송인자 돌연변이주의 활성질소종 스트레스 감수성이 무기인의 스트레스 반응대사 때문인지 알아보기 위해, 산화적 스트레스에 대한 감수성을 측정해보았다. LB 배지에서 *S. Typhimurium* WT,  $\Delta rpoS$ ,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $\Delta pitA$ 에  $H_2O_2$  1.25mM을 처리한 후 24시간 동안의 성장 패턴을 알아보았다(Fig. 7). 모든 균주는  $H_2O_2$ 를 처리하지 않은 조건이나  $H_2O_2$ 를 처리한 조건에서의 같은 성장 패턴을 보였다. 따라서  $\Delta pst$  operon와  $\Delta pitA$ 는 산화적 스트레스와는 상관없는 것을 확인하였다.  $rpoS$ 는 산화적 스트레스에 감수성을 가지는 대조 균주로 사용되었다.



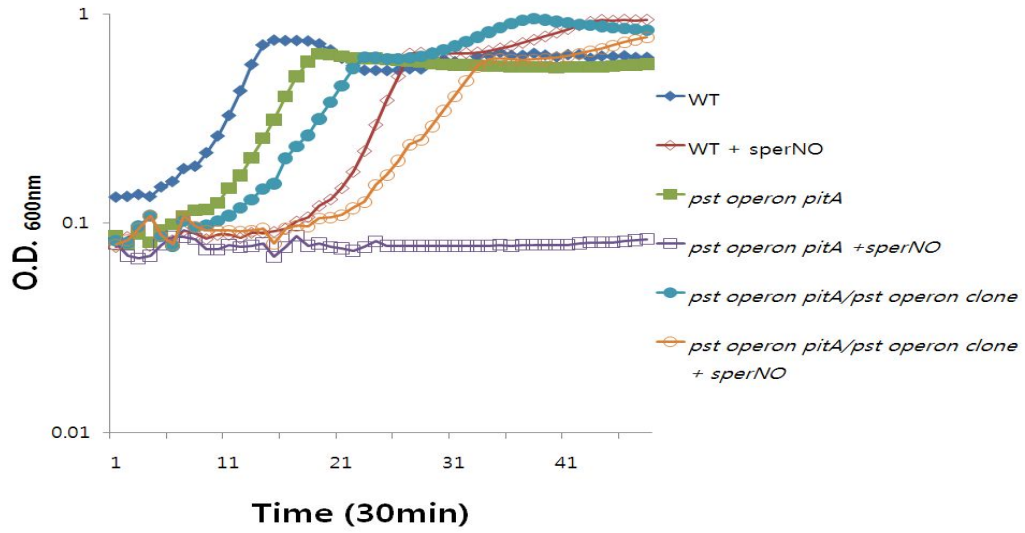
(A)



(B)

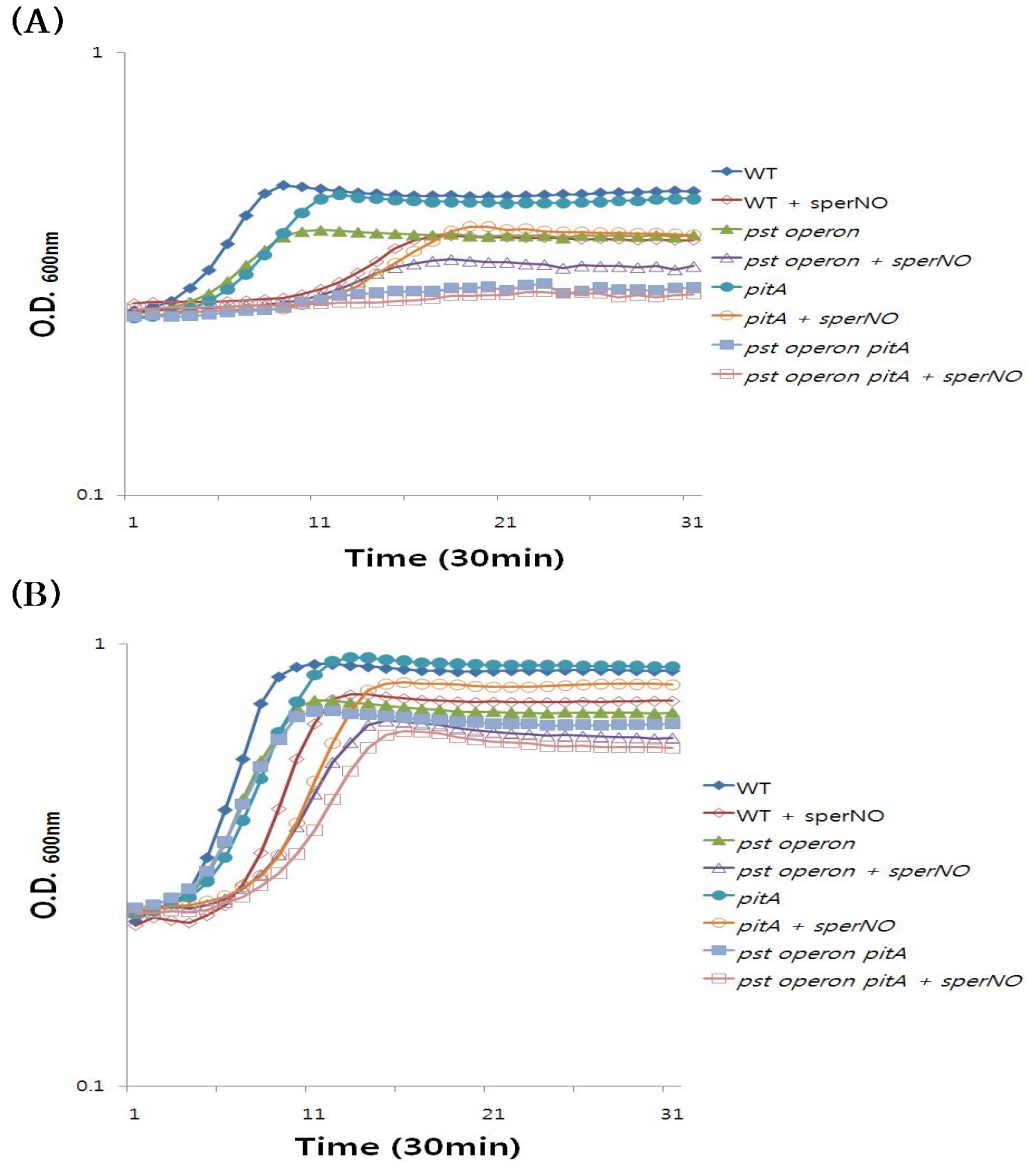


(C)



**Figure 5. Growth of WT and phosphate transporter mutants under nitrosative conditions.**

*S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells were cultured in the minimal E media with (opened symbols) or without (filled symbols) NO congeners spermineNONOate (1mM; **A**) and S-Nitrosoglutathione (1mM; **B**). **(C)** Effect of complimenting clone of *pst operon* was measured under same growth conditions used in (A).



**Figure 6. Effect of inorganic phosphate to the growth of WT and phosphate transporter mutants under nitrosative stress conditions.**

*S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells were cultured in MOPS media containing 0.1mM Pi(A) or 10mM Pi(B) with (opened symbols) or without (filled symbols) spermineNONOate(500µM).

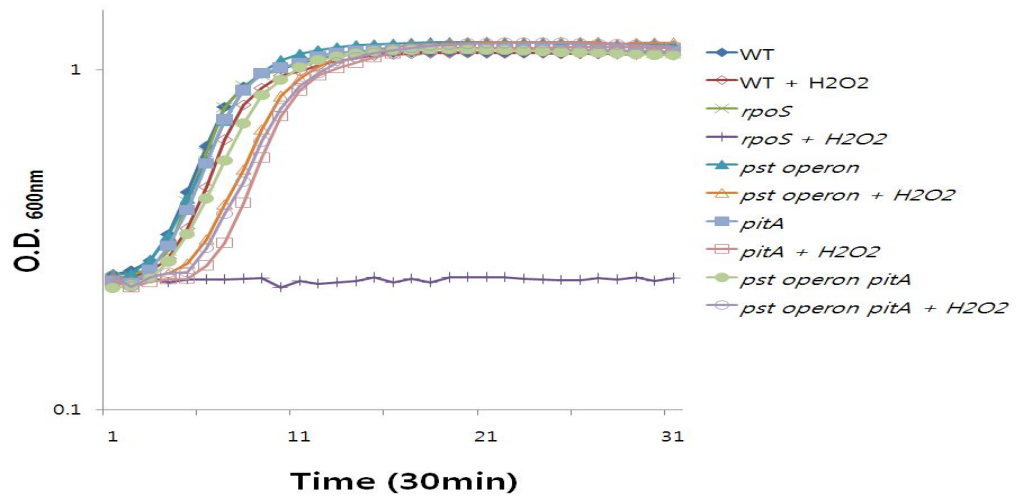
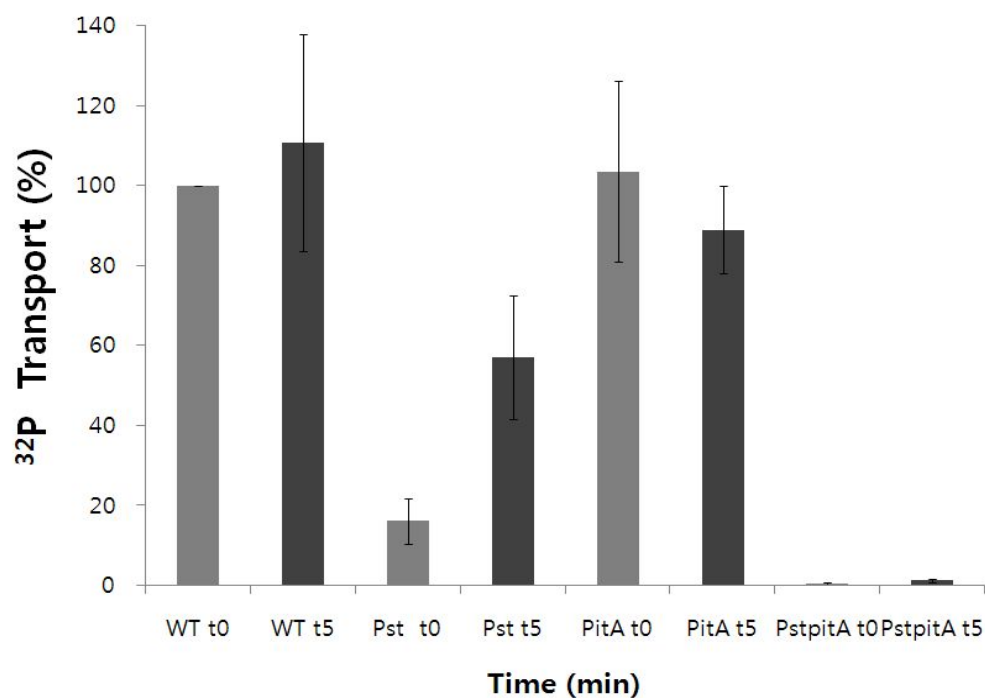


Figure 7. Growth of WT, *rpoS* and phosphate transporter mutants under oxidative stress conditions.

*S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells were cultured in LB media containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.25mM.

## 5. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 *Salmonella*는 무기인의 수송이 감소된다.

무기인을 수송하는 Pst 수송체와 Pit 수송체가 *S. Typhimurium*의 전체 무기인 수송 중 차지하는 역할을 알아보았다(Fig. 8). *S. Typhimurium* WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon *pitA*를 키운 후  $^{32}P$ 를 처리하고 바로 측정된 것을 t0로 하고  $^{32}P$ 를 처리하고 5분 후에 측정된 것을 t5로 하였다. 세균 안으로 들어간  $^{32}P$ 양을 측정해본 결과 WT 0분을 기준으로 해 100%(±0%)라고 하면 WT 5분은 111%(±27%)로 t0에 비교해서 11% 더 많이 무기인이 세균 안으로 들어갔다. 그리고  $\Delta Pst$  operon에서는 0분에서는 16%(±5.7%), 5분에서는 57%(±15.4%)로 WT에 비교해서 무기인 수송이 적게 되었다. 0분과 비교해서 5분에 무기인 수송이 41% 증가하였는데 이것은 Pit 수송체에 의해서 어느 정도 무기인이 수송되어진 것으로 보인다.  $\Delta pitA$ 에서는 0분에서 104%(±22.6%), 5분에서는 89%(±10.9%)로 나타났다. Pit 수송체는 무기인 수송에 큰 역할을 하지 않는 것으로 보이며 Pst 수송체가 돌연변이 되었을 때 무기인 수송을 대신하는 역할을 하는 것으로 판단된다. 그러나  $\Delta pst$  operon *pitA*에서는 0분, 5분에서 모두 0%(±0.4%), 1%(±0.46%)로 무기인 수송이 되지 않았다. 따라서 *S. Typhimurium*은 Pst 수송체와 Pit 수송체가 무기인 수송에 대표가 되는 수송체로 확인되었다.

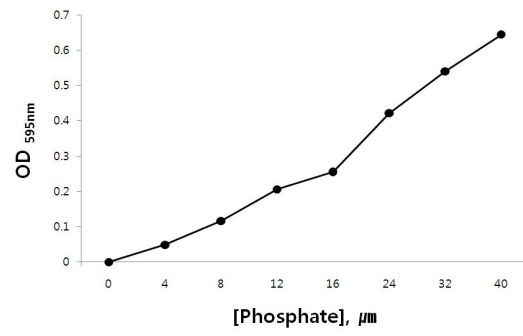


**Figure 8. The inorganic phosphate transport rate of *S. Typhimurium*.** *S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells were cultured in minimal E media and treated orthophosphate-<sup>32</sup>P](10uM). Radioactivity of bacterial cells was measured at the 0min and 5min after <sup>32</sup>P treatment.

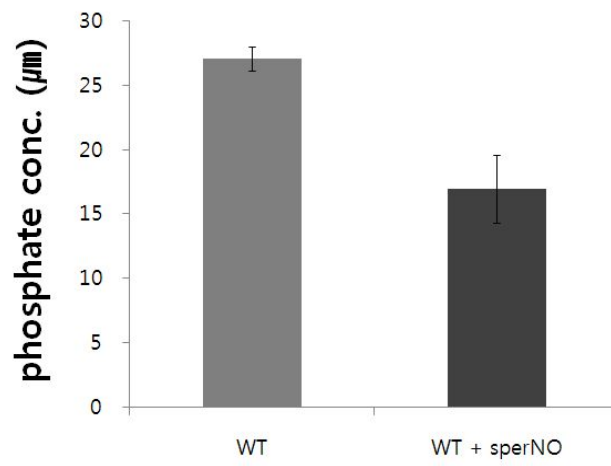
## 6. 산화질소에 의해 *Salmonella*의 내부 무기인 양이 감소된다.

*S. Typhimurium* WT에 sperNO 1mM을 30분 처리한 후 세포 안의 무기인 양을 측정하였다. WT의 무기인은  $27\mu\text{M}(\pm 0.9)$ 이고 WT에 sperNO를 30분 처리한 것에서는  $17\mu\text{M}(\pm 2.6)$ 이었다(Fig. 9B). sperNO를 처리한 WT의 세포 내 무기인 양이 37%정도 감소했다. sperNO와 무기인이 만나서 화학적으로 반응하는지 알아보기 위해 *in vitro*상에서 실험을 하였다.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0, 12.5, 25,  $50\mu\text{M}$ 과 sperNO 1mM를 반응시킨 후의 무기인 양은 sperNO를 처리한 것에서 약간씩의 감소는 보이나 거의 차이가 없었다(Fig. 9D). 무기인이 산화질소와 결합하지 않고 sperNO에서 산화질소의 리간드로 쓰이는 polyamine spermine과 결합하는 지 알아보기 위해 spermine 1mM을 처리하고  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $50\mu\text{M}$ 을 처리한 후 한 시간 후 무기인 양을 측정하였는데 차이가 없었다(Fig. 9C). 그리고 sperNO  $250\mu\text{M}$ 과  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $50\mu\text{M}$ 을 반응시킨 후 산화질소의 양을 측정하였을 때 역시  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 에서 산화질소의 양이 약간의 감소를 보이나 차이가 없었다(Fig. 10). 산화질소에 의해 무기인 수송체가 훼손되어 세균 안으로 무기인이 수송되지 못해 세포 내 무기인 양이 감소되는지 알아보기 위해  $^{32}\text{P}$ 를 이용해 실험하였다(Fig. 11). WT에 sperNO 1mM을 30분 처리하고  $^{32}\text{P}$ 를 처리한 후 0분, 5분, 16시간 때의  $^{32}\text{P}$  수송율은 sperNO를 처리해서 나온 count per minuit(cpm)값에서 처리하지 않은 cpm 값을 나눠서 백분율로 계산하였다. 0분에서는 sperNO를 처리한 것에서  $96.2\%(\pm 17.9\%)$ 로 4%의 감소가 보이나 오차 범위다. 5분에서는  $99.9\%(\pm 3.3\%)$ 로 sperNO를 처리하지 않는 것과 차이가 없으며, 16시간 이후에도  $89.4\%(\pm 9\%)$ 로 차이가 거의 없다. 따라서 산화질소를 처리해도 무기인 수송에는 문제가 없다. 따라서 세포 내 무기인 양의 감소는 세포 안에서 일어나는 아직 확인되지 않은 대사과정에 의해 감소되어진 것으로 보인다.

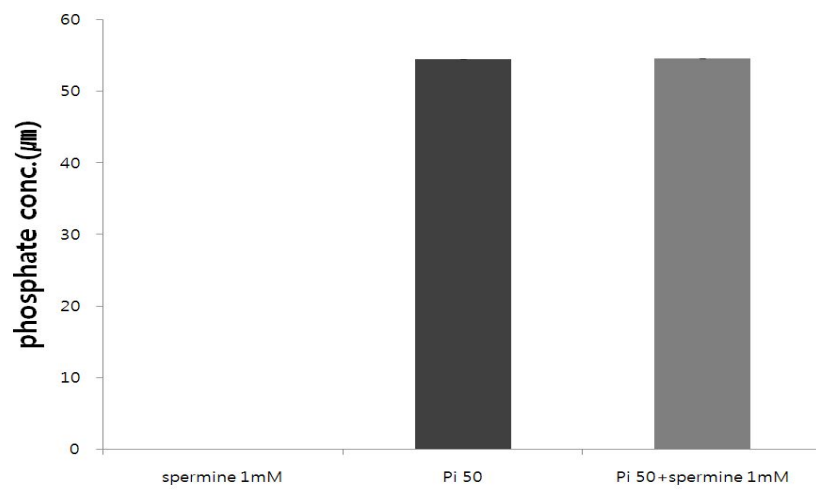
(A)



(B)

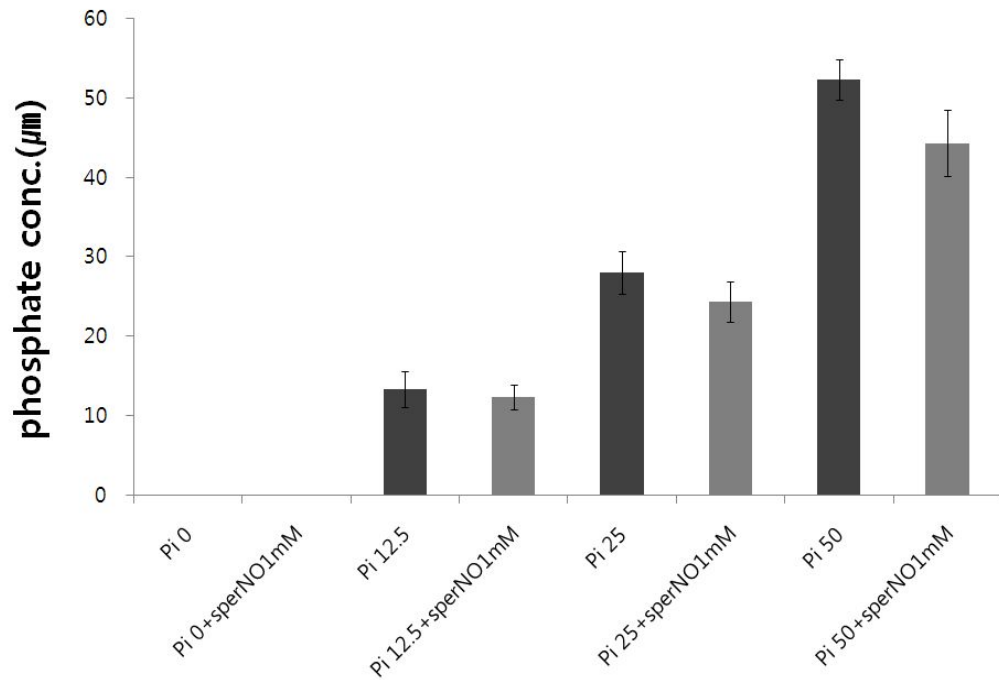


(C)





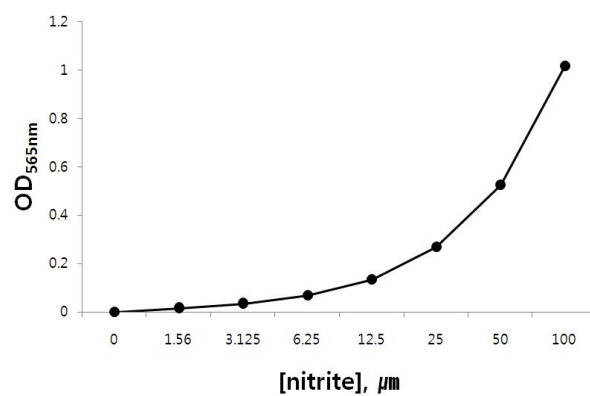
(D)



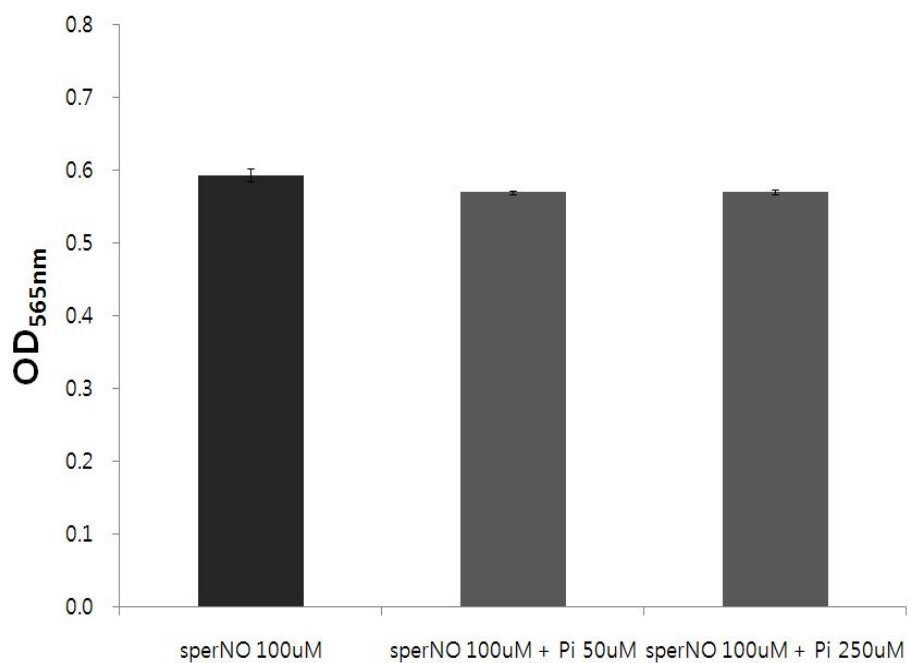
**Figure 9. Measurement of the inorganic phosphate by Malachite Green Phosphate Assay.**

(A) Inorganic phosphate standard curves. (B) *S. Typhimurium* WT cells were cultured in minimal E media and treated spermineNONOate 1mM for 30min. Inorganic phosphate levels of cell lysates were measured. (C) 50μM Pi was combined with spermine (1mM) for 60min at room temperature (D) 0, 12.5, 25, and 50μM Pi were combined with spermineNONOate (1mM) for 60min at room temperature.

(A)

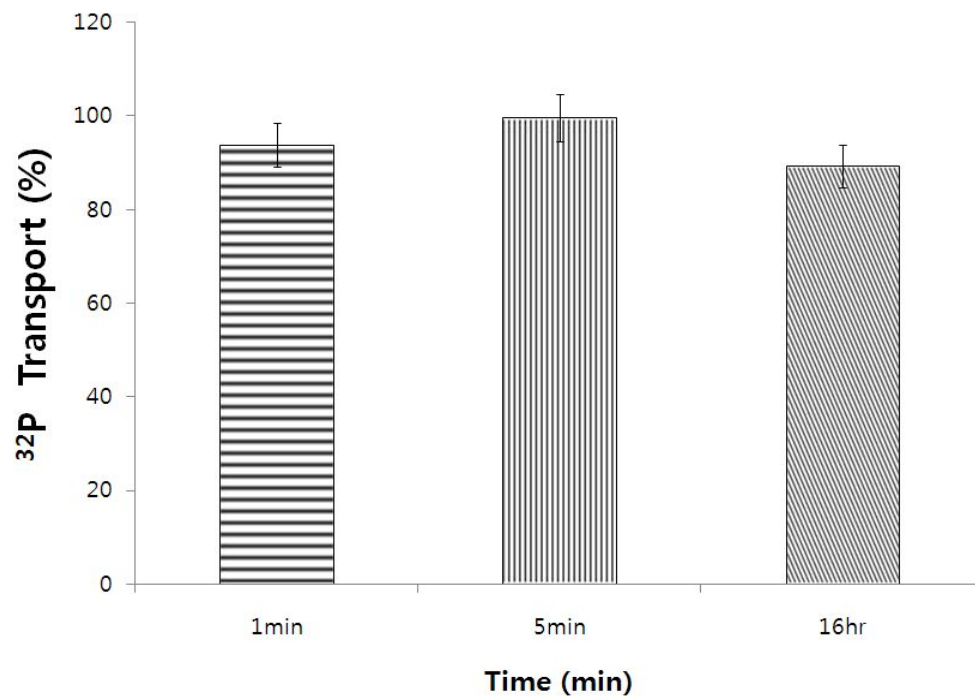


(B)



**Figure 10. Measurement of the nitrite by Griess Reagent.**

(A) Nitrite standard curves. (B) 50 $\mu\text{m}$  Pi was combined with spermineNONOate (100 $\mu\text{m}$ ) for 60min at room temperature.

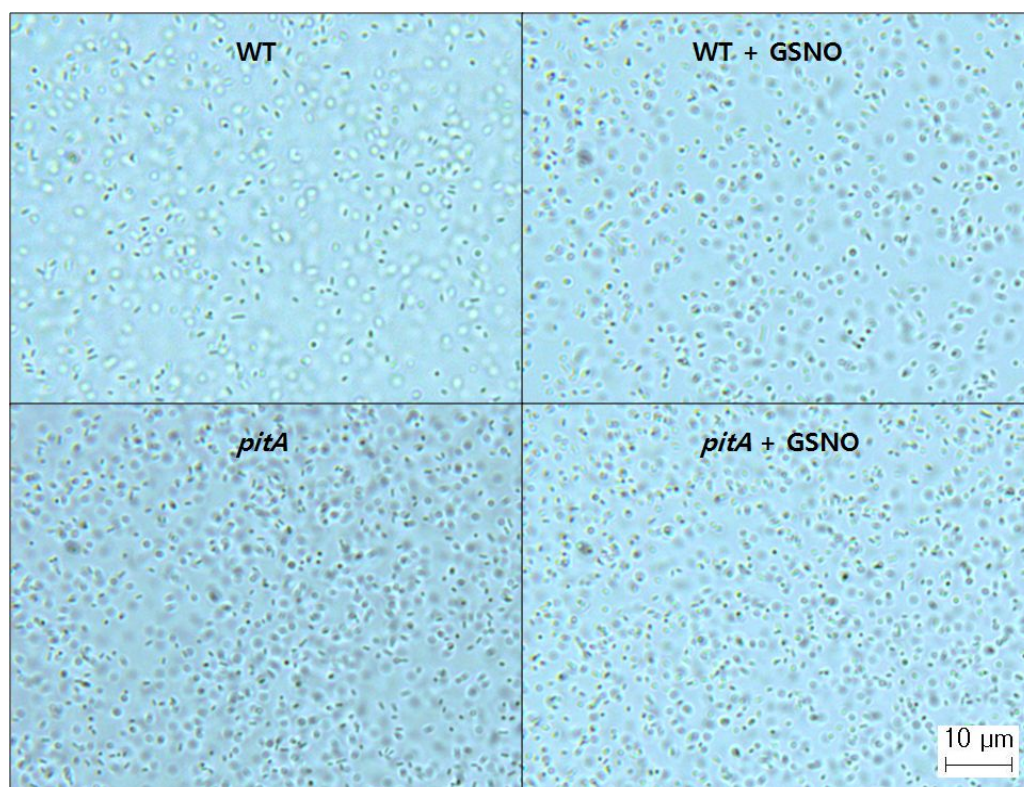


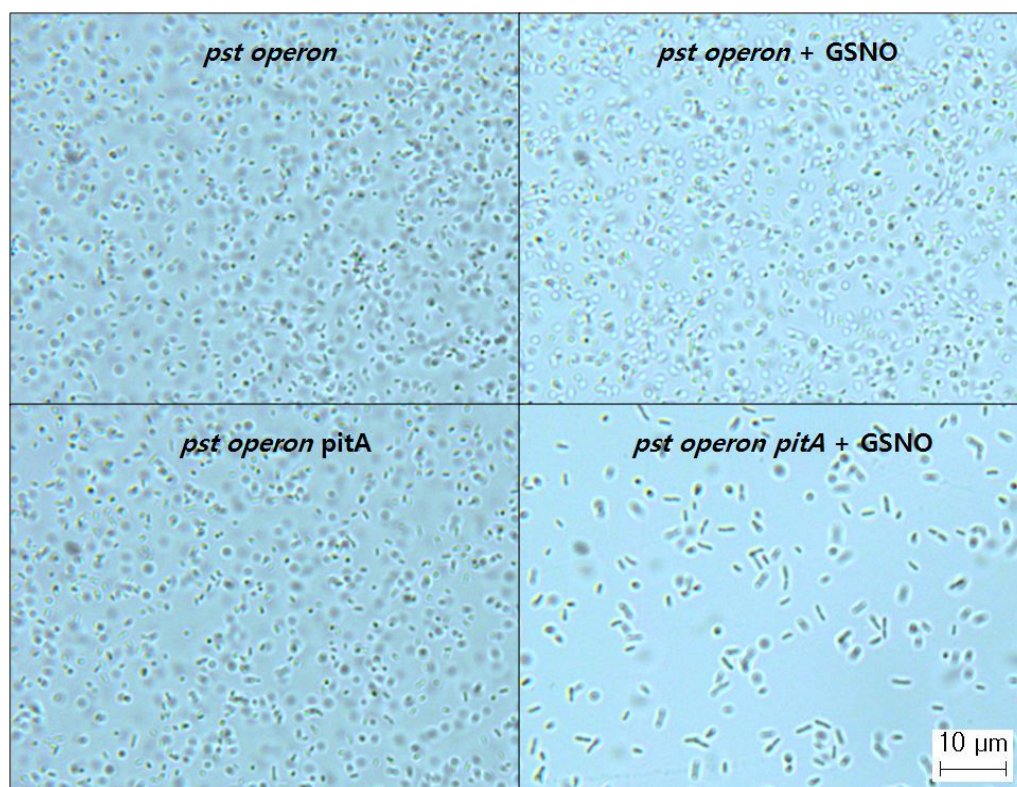
**Figure 11. The effect of RNS on the inorganic phosphate of *S. Typhimurium*.**

*S. Typhimurium* WT cells were cultured to log-phase ( $\text{O.D.}_{600\text{nm}} \sim 0.5$ ) in minimal E media, and treated with spermineNONOate (1mM) for 30min then orthophosphate- $^{32}\text{P}$  (10uM) was added to cultures. Radioactivity was measured at the 0min, 5min and 16hours.

## 7. 산화질소에 의해 무기인 수송인자가 돌연변이 된 *Salmonella*의 형태가 변한다.

*S. Typhimurium* WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 에 GSNO 1mM 을 처리하고 *S. Typhimurium*과 돌연변이 균주들의 형태를 관찰 하였는데  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 에 GSNO를 처리하지 않은 균주들의 형태는 WT과 비슷하다. 그러나 GSNO를 처리한 균주들을 보면 WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ 는 형태의 변화가 없으나  $\Delta pst$  operon  $pitA$ 에서는 형태가 길게 변했다(Fig. 12). 이것으로 보아 무기인 수송체가 전체가 돌연변이 되면 무기인이 균주 안으로 수송되지 못해 활성질소종 스트레스에 의해 세포 분열에 문제가 생겨 형태가 변화된 것으로 보인다. 따라서 활성질소종 스트레스로부터 오는 피해를 무기인이 보호하는 것으로 보인다.





**Figure 12. Morphology of WT and phosphate transporter mutants.**

*S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells were cultured to log-phase ( $\text{O.D.}_{600\text{nm}} \sim 0.5$ ) in minimal E media and treated with S-Nitrosoglutathione (1mM). After overnight incubation, bacterial cells were observed by Primo star light microscopy (x400).

8. 무기인 수송인자가 돌연변이 된 *Salmonella* 내에 산화질소가 축적된다.

S. Typhimurium WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $\Delta pitA$ 에 sperNO 3mM를 처리한 후 DAF-FM diacetate로 산화질소를 염색해 형광 현미경으로 세균의 산화질소의 분해 정도를 알아보았다(Fig. 14). DAF-FM diacetate는 산화질소의 공격을 받으면 강한 형광성을 띤다(Fig. 13). DAF-FM diacetate만 처리한 WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ ,  $\Delta pst$  operon  $\Delta pitA$ 에서는 형광 발현이 거의 되지 않았다. 그리고 WT,  $\Delta pst$  operon,  $\Delta pitA$ 에 sperNO를 처리한 것에서 역시 형광 발현이 거의 되지 않았다. 그러나 *pst* 오페론과 *pitA* 둘 다 돌연변이 된 경우에 sperNO를 처리하면 녹색의 형광물질이 많이 발현되었다. 따라서 무기인을 수송하지 못한 균주에 산화질소를 처리하면 산화질소가 분해되지 못하고 그대로 남아있는 현상을 확인했다.

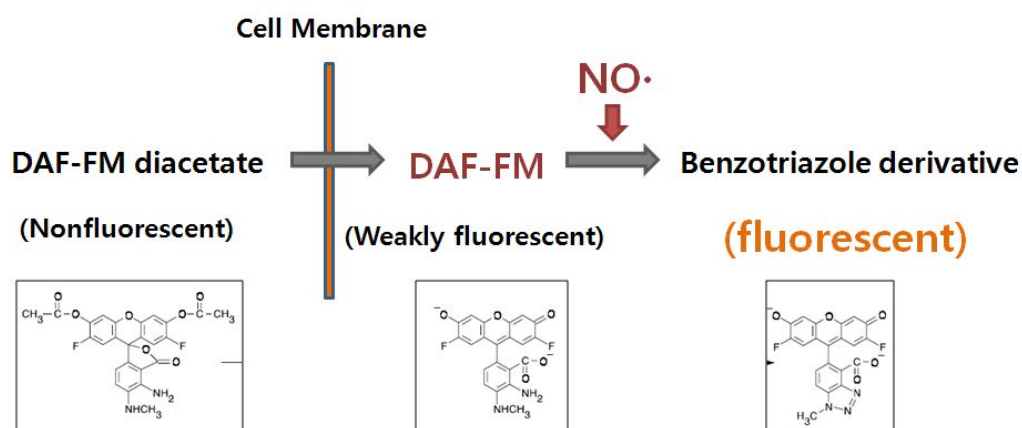
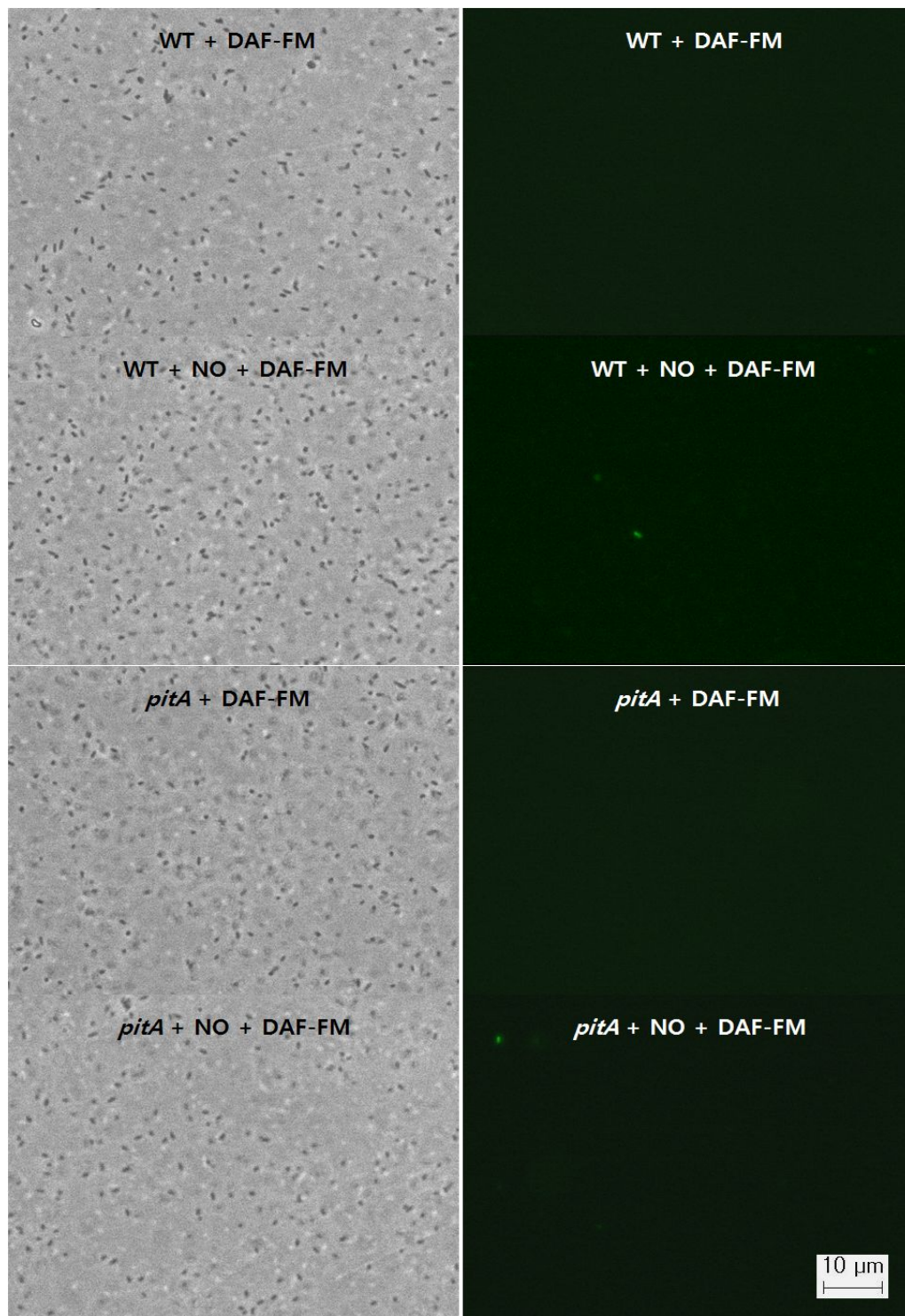
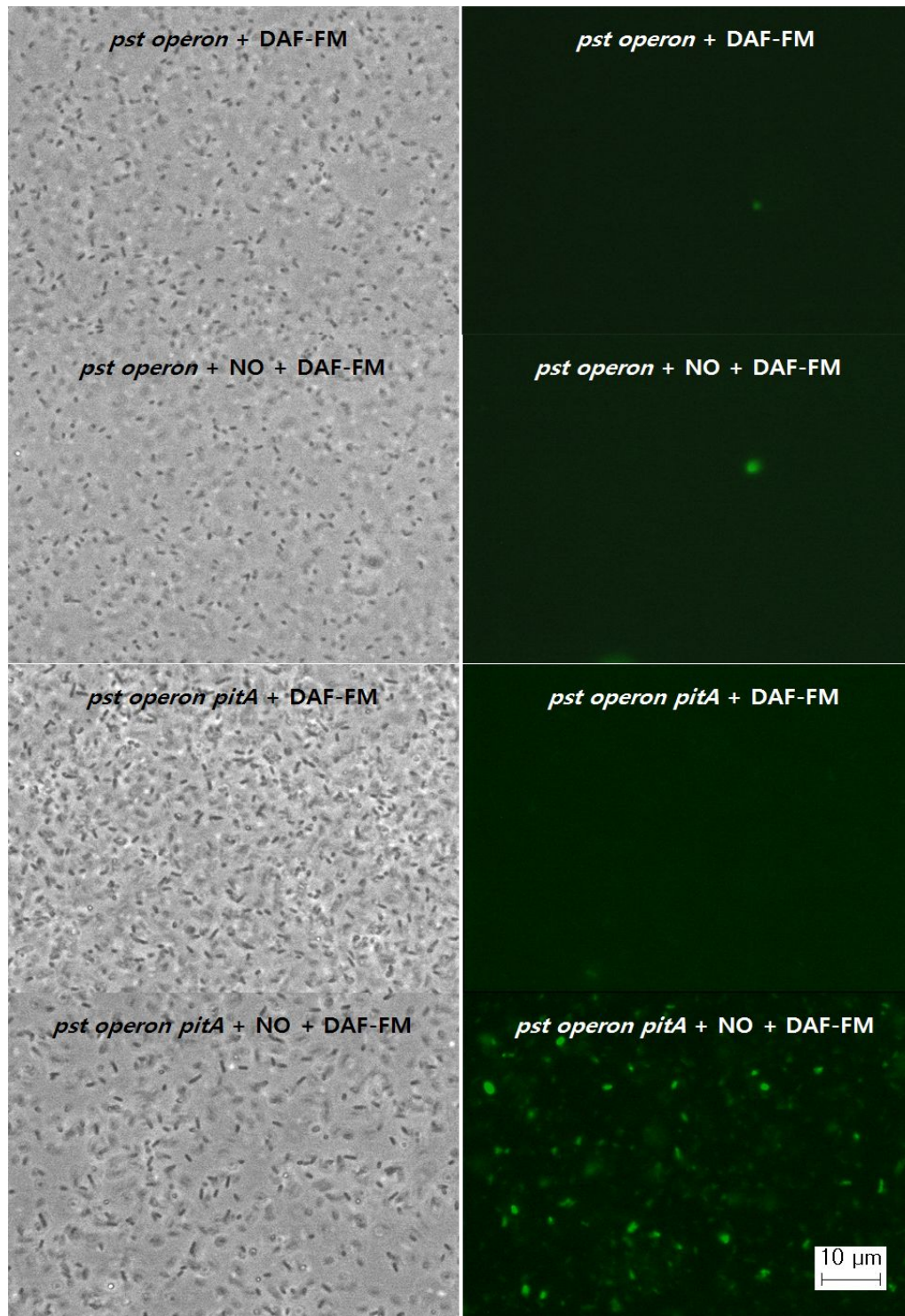


Figure 13. Reduction scheme for the detection of nitric oxide by DAF-FM and DAF-FM diacetate.







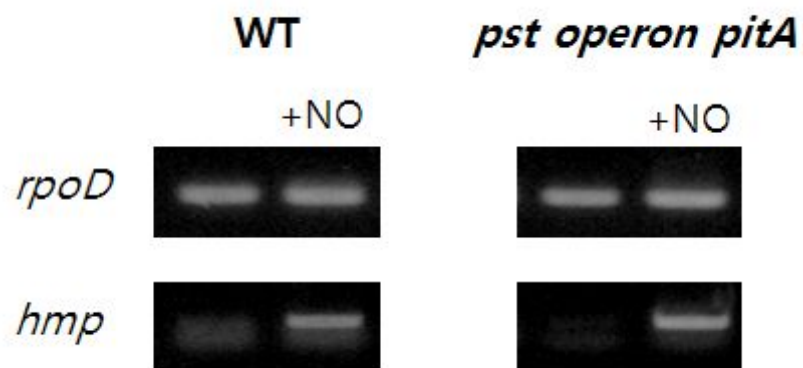


**Figure 14. Detection of Nitric oxide in wild-type and phosphate transporter mutants.**

*S. Typhimurium* WT, *pst operon*, *pitA* and *pst operon pitA* double mutant cells cultured to log-phase (O.D.<sub>600nm</sub>~0.5) in minimal E media and treated with spermineNONOate (3mM) for 6 hours, then DAF-FM diacetate was added to cultures for 2 hours. Fluorescence of bacterial cells was observed with Axioscope A1 Fluorescence Microscopy (x400).

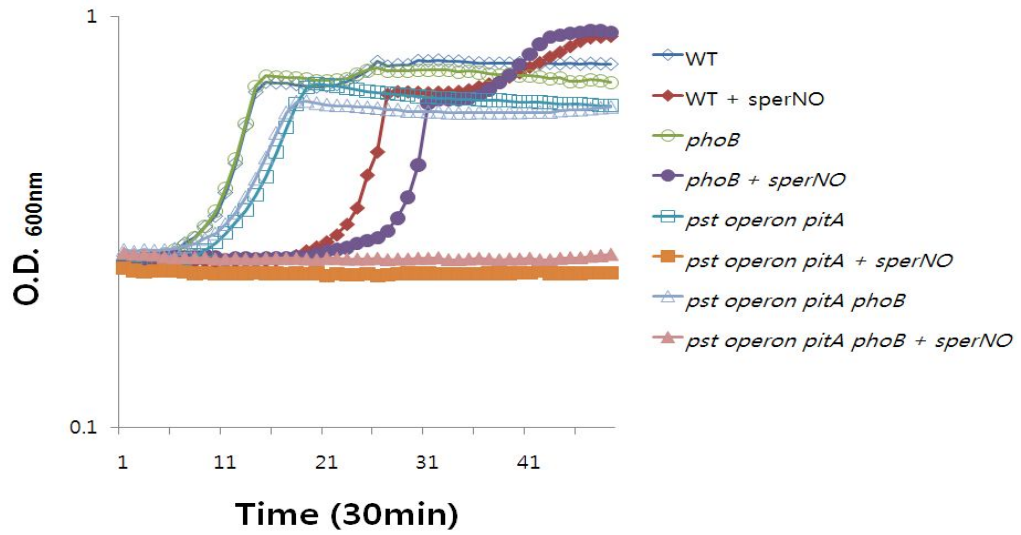
## 9. 무기인 수송인자 돌연변이는 *hmp*의 전사과정과 *phoB*의 발현에 영향을 미치지 않는다.

지금까지의 결과를 볼 때 활성질소종 스트레스는 무기인의 수송에는 직접적으로 관여 하지 않고, 세포 내부에서 화학적 혹은 생물학적으로 반응하는 것으로 보인다. 활성질소종이 무기인 수송에 훼손을 주지 않는 반면, 무기인 수송이 결핍된 균주에서 산화질소가 많이 축적된다는 결과를 볼 때 무기인이 수송 되지 않으면 *salmonella*의 산화질소 대사 효소인 *hmp*의 발현이 영향을 받는지 알아보았다. *S. Typhimurium* WT,  $\Delta$ *pst operon pitA*에 sperNO 3mM를 처리한 후 *hmp*의 전사 정도를 알아보았다(Fig. 15). WT,  $\Delta$ *pst operon pitA*에 sperNO를 처리 했을 때 모든 균주에서 *hmp*의 전사가 증가했다. 따라서 무기인이 들어오지 못하는 조건에도 *hmp* 전사에는 문제가 없었다. *pst* 오페론 돌연변이주에서는 세균 내에 무기인의 농도가 낮기 때문에 *phoB*가 계속 활성화 상태로 있을 것으로 예상된다. *E. coli*의 경우 *pst* 오페론 돌연변이 균주에서는 *phoB*가 과발현되어 세포 성장에 훼손을 줄 수 있다. 이 가능성을 검증하기 위해 *phoB* 돌연변이를 *pst operon pitA* 돌연변이주에 도입하여 활성질소종 감수성을 검사하였다(Fig. 14).  $\Delta$ *phoB*에 sperNO를 처리 한 경우 WT보다 약간 감수성을 가지나 거의 차이가 없다.  $\Delta$ *pst operon pitA*은 sperNO가 처리되었을 때 전혀 자라지 못했다. 그러나 *pst operon pitA phoB* 세 가지 모두 돌연변이 시켰을 때 역시  $\Delta$ *pst operon pitA*처럼 전혀 자라지 못했다. 따라서 *phoB*에 의한 Pho 레귤론 유전자들의 과발현과는 상관없이 산화질소에 감수성을 가진다.



**Figure 15. *hmp* transcription.**

*S. Typhimurium* WT and *pst operon pitA* double mutant cultured to log-phase (O.D.<sub>600nm</sub> ~0.5) in the minimal E media, and treated with spermineNONOate (3mM).



**Figure 16. Growth of WT, *phoB* and phosphate transporter mutants under nitrosative conditions.**

*S. Typhimurium* WT, *phoB* and *pst operon pitA phoB* triple mutant cells were cultured in the minimal E media media containing no (open symbol) and 1mM spermineNONOate.

## V. 고 찰

*Salmonella*는 활성산소종이나 활성질소종에 저항성을 가진다. 활성질소종은 많은 세포적 대사과정을 통해서 해독되는데, 실험을 통해 무기인이 활성질소종의 저항성을 위해 꼭 필요하다는 것을 확인 하였다. *S. Typhimurium*에 활성질소종 스트레스를 주면 *pst* 오페론의 전사가 증가하고 Pst 무기인 수송 시스템과 관련된 단백질들이 활성화 된다. Pst 수송체의 활성화로 세포질 밖에 있던 무기인이 세포질 안으로 수송 된다. Pst 수송체와 Pit 수송체에 의해서 무기인이 들어오는데 *pitA* 돌연변이에  $^{32}\text{P}$ 를 처리한 후 바로 무기인 수송 율을 측정하였을 때 *S. Typhimurium* 야생형 균주와 같은 수치가 나왔다. 이것은 Pst 수송체에 의해서 우선적으로 무기인이 수송된다는 것을 알 수 있다(Fig. 8). *Pst* 오페론과 *pitA*가 둘 다 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 sperNO를 처리한 후 DAF-FM diacetate를 처리해 형광현미경으로 보았을 때 산화질소가 세균 안에서 해독되지 못하고 그대로 남아있는 것을 볼 수 있다(Fig. 14). 세포질 안으로 무기인이 들어오지 못해 *hmp*의 활성이 억제 되어 산화질소가 해독되지 못해 세포 내에 그대로 남아있어 *pst operon pitA* 돌연변이가 자라지 못하는 것인지 의문을 가졌다. 그러나 *pst operon pitA* 돌연변이에 sperNO를 처리하고 *hmp*의 전사량을 보았을 때, *hmp* 발현은 여전히 활성화 되고 있는 것을 확인하였다(Fig. 15). 따라서 *Salmonella* 세포질 안으로 들어온 무기인이 활성질소종 스트레스로 부터 오는 세포적 손상을 막기 위해 아직 알려지지 않는 대사과정이 일어나는 것으로 보여진다. *Halobacterium salinarum* R1은 무기인 수송체가 *pst1*과 *pst2*가 있다 [20]. 주화성실험을 통해 세균이 무기인 쪽으로 이동하는 것을 보여주는데 이처럼 생존을 위해 무기인을 필요로 한다는 것을 보여준다. *S. Typhimurium*도 0.1mM 무기인 조건보다 10mM 무기인 조건에서 *S. Typhimurium*의 수가 두 배 정도 증가한다(Fig. 2). 무기인이 *Salmonella*의 증식을 향상시킨 다는 것을 보여준다. *pst* 오페론 돌연변이는 활성질소종 스트레스에 감수성을 가진다. *pst* 오페론 돌연변이주에 무기인이 들어오지 못해 세포 내에서는 계속적으로 무기인이 들어올 수 있게 *phoB*가 활성화 되어있다. *phoB*의 과발현에 의해 *pst* 오페론이

산화질소에 감수성을 가지는지 확인하였다. 그러나 *pst operon pitA phoB* 모두 돌연변이 된 *S. Typhimurium*이 여전히 산화질소에 감수성을 가졌다(Fig. 16). *pst* 오페론의 *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU* 각각의 돌연변이를 만들고 각각의 돌연변이에 sperNO를 처리한 후 성장 곡선을 측정하였는데, *pstS*와 *pstC*, *pstA*, *pstB*가 각각 하나씩 돌연변이 되었을 때는 활성질소중 스트레스에 감수성을 거의 보이지 않았다. 반면 *phoU*가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 sperNO를 처리하면 전혀 자라지 못했다(data not shown). *pst* 오페론이 전부 돌연변이 된 경우보다 *phoU*만 돌연변이 되었을 때가 더욱더 활성질소중 스트레스에 감수성을 가졌다. 이것으로 보아 억제자인 PhoU가 세포질 안의 무기인 농도를 조절 하는 과정에서 산화질소와 관련된 아직 알려지지 않는 대사과정이 일어나는 것으로 보인다. *E. coli*와 *Synechocystis* sp. Strain PCC6809 모델에서 *phoU*가 돌연변이 되었을 때 세균안에 중합인산염 과립들(polyphosphate granules; PPGs)이 축적된다고 알려졌다[21-22]. 중합인산염(polyphosphate; polyP)은 중합인산염 인산화효소(polyphosphate kinase; PPK)에 의해서 합성된다. 무기인 수송자에 의해 들어온 무기인은 ATP와 같은 고에너지를 이용해서 인산기를 붙여서 중합인산염을 만든다[23]. 이때 ATP는 아세테이트에서 아세틸코에이로 만들어지는 과정에서 나온 ATP다[24]. 중합인산염은 고에너지를 축적하고 있기 때문에 세포에 에너지가 부족할 때에는 고에너지 인산화합물인 포스포겐을 이용하기도 한다[25]. PPK는 세균이 정지상에 들어가면 활성이 증가하는데 이것은 중합인산염이 ATP의 저장소 역할을 한다는 것을 보여준다[26]. 세포질 안에 인산염이 부족할 때에는 exopolyphosphatase(PPX)에 의해서 중합인산염이 잘려져 무기인을 제공한다. 그러나 세포질 안에 무기인이 많아지면 PhoU 단백질이 활성화 돼 PPX를 억제하고 무기인의 제공을 중단한다. PhoU는 또 Pst 무기인 수송 시스템을 억제해 더 이상 무기인이 세포질 안으로 수송되지 못하게 한다[25]. 따라서 활성질소중 스트레스와 중합인산염의 관계를 생각해볼 때 *phoU*가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 중합인산염이 축적되고 여기에 산화질소를 처리하면 *S. Typhimurium*은 전혀 자라지 못하는 것으로 볼 때 중합인산염이 많을 때 산화질소에 감수성을 가진다는 결론을 생각해 볼 수 있다. 그러나 PPK나 PPX가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 활성질소중 스트레스를 주었을 때 앞서와는 다

른 결과가 나왔다(data not shown). *PPK*가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 *sperNO*를 처리하면 전혀 거의 자라지 못했다. *PPK* 돌연변이는 중합인산염을 만들지 못하는 영향으로 활성질소종 스트레스에 대한 저항성과 관련된 대사과정이 일어나지 못해 *S. Typhimurium*이 자라지 못하는 것으로 생각된다. 그러나 *PPX*가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 *sperNO*를 처리하면 *S. Typhimurium*은 산화질소에 대한 감수성이 약간 보이나 거의 없었다. *PPX* 돌연변이는 중합인산염이 하나의 무기인으로 잘리지 못하고 계속 중합인산염 형태로 축적되어 있어 산화질소에 감수성을 가질 것이라 생각했지만 그렇지 않았다.

따라서 앞으로의 연구에서 각각의 돌연변이의 중합인산염 양을 측정하고, 중합인산염을 염색하는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 이용해 형광현미경으로 직접 중합인산염을 관찰해 봐야 할 것이다. 그리고 세균에서 무기인의 농도를 직접적으로 조절한다고 알려진 *PhoU*가 *S. Typhimurium*에서 어떤 단백질과 연결돼서 무기인의 농도를 조절하고 왜 *phoU* 하나만 돌연변이 되었을 때 활성질소종에 강한 감수성을 가지는지 알아봐야 한다.

이 논문의 결론은 무기인을 수송하는 *Pst* 수송체와 *Pit* 수송체가 돌연변이 된 *S. Typhimurium*에 활성질소종 스트레스를 주었을 때, *S. Typhimurium*은 전혀 성장하지 못했고 세포 분열에 문제가 생겨 형태에 변화가 생겼다. 그리고 *S. Typhimurium* 내에 산화질소가 축적되었다. 따라서 이 논문은 *S. Typhimurium*의 무기인이 활성질소종에 저항성을 가질 수 있게 하는 중요한 요소라는 것을 처음으로 밝힌 논문이다.



## VI. 참 고 문 헌

1. Kim, K.S., et al., Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(11): p. 7675-80.
2. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravortty, The LysR-type transcriptional regulator Hrg counteracts phagocyte oxidative burst and imparts survival advantage to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology, 2008. 154(Pt 9): p. 2837-46.
3. Richardson, A.R., et al., The Base Excision Repair system of *Salmonella enterica* serovar typhimurium counteracts DNA damage by host nitric oxide. PLoS Pathog, 2009. 5(5): p. e1000451.
4. Lahiri, A., P. Das, and D. Chakravortty, Arginase modulates *Salmonella* induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for *Salmonella* pathogenesis in mice model of infection. Microbes Infect, 2008. 10(10-11): p. 1166-74.
5. Espey, M.G., et al., Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. J Biol Chem, 2000. 275(15): p. 11341-7.
6. Butler, A.R. and I.L. Megson, Non-heme iron nitrosyls in biology. Chem Rev, 2002. 102(4): p. 1155-66.
7. Cooper, C.E., Nitric oxide and iron proteins. Biochim Biophys Acta, 1999. 1411(2-3): p. 290-309.
8. Schopfer, F.J., P.R. Baker, and B.A. Freeman, NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? Trends Biochem Sci, 2003. 28(12): p. 646-54.
9. Bang, I.S., et al., Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *salmonella* flavohemoglobin *hmp*. J Biol Chem, 2006. 281(38): p. 28039-47.

10. Tornberg, D.C., et al., Exhaled nitric oxide before and after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass--response to acetylcholine and nitroglycerin. *Br J Anaesth*, 2005. 94(2): p. 174-80.
11. Rui, B., et al., A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC Syst Biol*, 2010. 4: p. 122.
12. Aguen, M., E. Yagil, and B. Spira, Transcriptional analysis of the *pst operon* of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics*, 2002. 268(4): p. 518-24.
13. Lamarche, M.G., et al., The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2008. 32(3): p. 461-73.
14. Fiedler, T., et al., The two-component system PhoPR of *Clostridium acetobutylicum* is involved in phosphate-dependent gene regulation. *J Bacteriol*, 2008. 190(20): p. 6559-67.
15. Yuan, Z.C., et al., Genome prediction of *PhoB* regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(9): p. 2686-97.
16. Rice, C.D., et al., Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(3): p. 573-82.
17. Hoffer, S.M. and J. Tommassen, The phosphate-binding protein of *Escherichia coli* is not essential for P(i)-regulated expression of the *pho* regulon. *J Bacteriol*, 2001. 183(19): p. 5768-71.
18. Gebhard, S., N. Ekanayaka, and G.M. Cook, The low-affinity phosphate transporter PitA is dispensable for in vitro growth of *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol*, 2009. 9: p. 254.
19. Jackson, R.J., et al., Expression of the *PitA* phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. 289(2): p. 219-24.

20. Furtwangler, K., et al., Regulation of phosphate uptake via Pst transporters in *Halobacterium salinarum* R1. Mol Microbiol, 2010. 76(2): p. 378-92.
21. Kashiwara, H., et al., Electron microscopic analysis of heat-induced leakage of polyphosphate from a *phoU* mutant of *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. 74(4): p. 865-8.
22. Morohoshi, T., et al., Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. Appl Environ Microbiol, 2002. 68(8): p. 4107-10.
23. Freimoser, F.M., et al., Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. Genome Biol, 2006. 7(11): p. R109.
24. Kato, J., et al., Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. Appl Environ Microbiol, 1993. 59(11): p. 3744-9.
25. Kuroda, A. and H. Ohtake, Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. Biochemistry (Mosc), 2000. 65(3): p. 304-8.
26. Rao, N.N., S. Liu, and A. Kornberg, Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. J Bacteriol, 1998. 180(8): p. 2186-93.
27. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6640-5.

## VII. 국 문 초 록

### 살모넬라의 산화질소 저항성에서 무기인의 역할

임 나 라

조선대학교 대학원

치의생명공학과

지도교수 : 방 일 수

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium과 같은 병원성 세균은 동물 숙주에 의해 생성된 산화질소(nitric oxide; NO)와 산화질소와 관련된 활성질소종의 공격으로부터 저항성을 가진다. 본 논문에서는 *S. Typhimurium*의 무기인 수송자가 활성질소종 스트레스로부터 오는 피해를 막기 위해 필수적인 것을 확인하였다. *S. Typhimurium*의 무기인 항상성은 두 가지의 무기인 수송자에 의해 조절된다. 하나는 높은 친화력을 가진 인산염 수송자, Pst이고 다른 하나는 낮은 친화력을 가진 인산염 수송자, Pit이다. Pst와 Pit 무기인 수송자가 모두 돌연변이된 *S. Typhimurium*은 spermineNONOate 등의 산화질소 공여체가 들어간 배지에서 잘 성장하지 못하였으며, 이 돌연변이주에 *pst* 오페론을 갖는 플라스미드 클론을 형질전환시키면 야생형 균주의 성장 속도와 유사하게 성장이 회복되었다. 산화질소에 의해 *pst* 오페론의 전사는 크게 유도되었으나 *pit* 오페론의 전사는 변화가 없었는데, 이 현상은 무기인이 결핍되는 조건에서의 두 오페론의 전사 양상과 같았다. 또한, 실험실 조건 (*in vitro*) 에서 무기인과 산화질소를 반응시키고 무기인의 양을 측정하면 두 요소의 양적 변화가 관찰되지 않았으나, 산화질소에 노출된 *Salmonella* 내부의 무기인 양은 감소하였다. 이것은 무기인과 산화질소가

서로 연관되어 상호작용 한다는 것을 보여준다. 현미경 관찰을 통해, 산화질소를 처리한 *pst pit* 무기인 수송자 돌연변이주의 형태가 길어지고, 산화질소-특이적 형광 표지자인 DAF-FM(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluor-escein) diacetate를 처리 하였을 때 세포내부 형광도가 크게 증가하는 것을 확인하였다. 이것은 정상적인 세포분열과 산화질소 대사과정 기능에 훼손이 생긴 다는 사실을 보여준다. 결론적으로, 본 연구를 통해 활성질소종 스트레스 조건에서 무기인 항상성이 *Salmonella*의 생존을 위해 필수적이라는 사실을 발견하였다.